BIDRAG TIL KJENDSKABET

OM

LØPETS FYSIOLOGISKE KEMI

AF

SIGVAL SCHMIDT-NIELSEN

(Videnskabs-Selskabets Skrifter. I. Math.-Naturv. Klasse. 1908. No. 9)

UDGIVET FOR FRIDTJOF NANSENS FOND.

CHRISTIANIA
I KOMMISSION HOS JACOB DYBWAD
1908

Fremlagt i den math.-naturv. Klasses Møde den 31te Januar 1908 af Professor Torup.

A. W. BRØGGERS BOGTRYKKERI

Indhold.

Indledning.

Siden Hammarsten i 1872 ved sine grundlæggende undersøgelser over koagulationen af melk med slim fra kalvemaver viste os, at aarsagen til, at spædkalvens løpemave kan yste melk, er at søge deri, at den indeholder et særskilt enzym, løpe, der omdanner melkens kasein til et nyt tyngere opløseligt stof, parakasein, er der fremkommet en aldeles uoverskuelig literatur over, hvad man i korthed kan kalde melkens ystning.

Det har vist sig, at løpe eller chymosin, som det ofte kaldes, er et i naturen særdeles udbredt enzym. Det findes ikke alene, som man til at begynde med troede, i løpemavens slim og i mavesaften fra kalv; men det viser sig, at det findes i maven hos de forskjelligste pattedyr, hos fugle og fiske, idethele hos alle mulige dyr, som har en anatomisk udviklet mave. Løpe eller, mere korrekt udtrykt, ævnen til ved neutral reaktion at koagulere melk, d. v. s. at forandre dens kasein saaledes, at det falder ud, findes videre i organer, væv samt sekreter fra de forskjelligste steder i dyreriget. Og ikke nok med, at melkekoagulerende enzymer har vist sig at være udbredt overalt i dyreriget, det har ogsaa vist sig, at denne egenskab har en ganske almindelig udbredelse i planteriget, saaledes hos tættegræs *(pinguicula)*, hos *galium verum*, melontræet *(carica papaya)*, soldug *(drosera)*, i forskjellige plantefrø (som f. eks. ricinus) samt et stort antal bakterier som *B. prodigiosus* og *tyrothrix*-arter.

Og det mærkværdige med denne almindelige udbredelse af den melkekoagulerende egenskab eller løpe, som man oftest ret og slet betegner den — ihvorvel det ikke kan antages overalt at være et eneste, men formodes at være flere hverandre meget nærstaaende enzymer — er, at den, aldeles som tilfældet er med slimet fra maveslimhinden eller mavesaften, altid har været fundet som en tro ledsager af pepsin, det enzym, der spalter æggehviden ved sur reaktion.

Hvad mavesaftens pepsin angaar, har det ikke været nogen vanskelighed at skaffe sig fuld vished for, hvilken dets fysiologiske betydning er.

Helt anderledes er det derimod med løpet. Tiltrods for, at man i de sidste 35 aar har faaet adskillig kjendskab til dets egenskaber og forekomst, er man aldeles ikke kommet et skridt nærmere med hensyn til at vide noget om dets fysiologiske betydning. Man ved, som allerede nævnt, at løpet bevirker en kemisk forandring af kaseinet, der sekundært gir anledning til en koagulation; men mere ved man heller ikke. Selv en som man skulde antage saa enkel sag som, hvilke kemiske forandringer der egentlig sker med kaseinet, er denne dag et omtvistet spørgsmaal.

Dette har efterhaanden ført til, at man har spurgt sig: Har da løpet overhovedet nogen fysiologisk betydning?

Man er enig om, at løpet hidtil har vist sig at være uden enhver indflydelse paa alle andre native æggehvidestoffe end netop kaseinet. Men om saa er tilfældet, hvad opgave har det da at fylde hos fugle og fiske og de forskjelligste steder i planteriget, hvor det dog ikke træffer sammen med kasein?

Da det nu, saavidt man hidtil ved, altid i naturen optræder som en tro ledsager af pepsinet, kom enkelte forskere som Nencki og Sieber, Pekelharing samt Pawlow og Parastschuk paa den tanke, at løpet overhovedet ikke skulde være et selvstændigt enzym, men at pepsin- og løpevirkningen skulde fremkaldes af et og samme enzymmolekyl.

Nencki og Sieber[1] og Pekelharing[2] forestiller sig sagen paa den maade, at der i mavesaften skulde findes et stort enzymmolekyl udstyret med sidekjæder, en udøvende æggehvidedigestion, en anden som helt uafhængig heraf udøvede en melkekoagulerende virkning. Medens disse forfattere saaledes erkjender virkningerne som selvstændige, ihvorvel de ved sin »sidekjæde« vil give et udtryk for, at de to virkninger materielt synes at følges ad, forsaavidt som man hidtil ikke har fremstillet et løpefrit pepsin, gaar Pawlow og Parastschuk[3] betydelig videre, idet disse forskere bestrider, at der overhovedet eksisterer nogen selvstændig løpevirkning.

---

[1] M. Nencki und N. Sieber: Beiträge zur Kenntnis des Magensaftes und der chemischen Zusammensetzung der Enzyme. *Hoppe-Seylers Zeitschrift.* Bd. XXXII. 1901. S. 291.

[2] C. A. Pekelharing: Mitteilungen über Pepsin. *Hoppe-Seylers Zeitschrift.* Bd. XXXV. 1902. S. 8.

[3] I. P. Pawlow und S. W. Parastschuk: Ueber die ein und demselben Eiweissfermente zukommende proteolytische und milchkoagulierende Wirkung verschiedener Verdauungssäfte. *Hoppe-Zeylers Zeitschrift.* Bd. XLII. 1904. S. 415.

Pawlow og hans assistent gjør sig til talsmænd for, at melkens koagulation med løpe egentlig kun er en pepsinvirkning. Disse forskere støtter sin anskuelse paa en række forsøg med naturlig hundemavesaft, i hvilken de har kunnet paavise en regelmæssig parallelitet mellem æggehvidefordøiende og melkekoagulerende ævne, medens de ældre forskere, som har udtalt sig for en materiel enhed mellem pepsin og løpe, ikke støtter denne sin opfatning paa specielle for løsningen af dette spørgsmaal udførte forsøg, men paa spekulationer.

Pawlow er saaledes den eneste, som støtter sin opfatning paa virkelig eksperimentel basis. Hans anskuelse meddeltes første gang ved naturforskermødet i Helsingfors i juli 1902. Den vakte der en del modsigelse, navnlig fra Hammarsten, der fremholdt, at Glaesners undersøgelser over propepsinet ikke lod sig forene med Pawlows opfatning. Efter at Pawlows undersøgelser blev tilgjængelige i den tyske literatur, har de givet anledning til en del diskussion. Den første, som udtalte sig, var Bang[1], der anser, at Pawlows koagulationsforsøg med hundemavesaft viser, at han ikke har havt almindeligt chymosin, som vi typisk faar det fra kalvemaven, men parachymosin, et almindeligt løpe nærstaaende enzym, der efter Bang bl. a. findes i svine- og menneskemaven. Pawlow skulde saaledes aldrig have sammenlignet virkeligt typisk chymosin med pepsin, og hans forsøg vil jo i saa fald ikke kunne anvendes i diskussionen om identitetsspørgsmaalet.

Hemmeter[2], som ogsaa har udtalt sig imod Pawlow, iagttog ved sine forsøg, at mavesaft fra mennesker kunde vise pepsinfordøielse uden samtidig at have melkekoagulerende ævne. Disse forsøg er forsaavidt i overensstemmelse med angivelser fra den ældre literatur, hvor der findes adskillige eksempler paa, at der i mavesaft ikke samtidig er paavist pepsinfordøielse og melkekoagulation. Der bør i denne forbindelse, ihvorvel sagen i nutiden maa ansees at være af mere end tvivlsom værdi, erindres om, at fravær af melkekoagulerende ævne hos mavesaften af klinici har været anseet som et kriterium paa tilstedeværelsen af cancer. De forskjellige angivelser om, at en mavesaft fra begyndelsen af har savnet den ene eller anden ævne, maa selvsagt tages med særdeles stor kritik. Det kan meget vel hænde, at man ved selve forsøgenes udførelse ikke har skaffet de for begge enzymvirkningers udfoldelse gunstigste betingelser.

---

[1] Ivar Bang: Über Parachymosin, ein neues Labferment. *Pflügers Archiv.* Bd. LXXIX. 1900. S. 425.

[2] I. C. Hemmeter: Are the proteolytic and milk coagulating effects of gastric and pancreatic juice due to one and the same enzyme. *Berliner klinische Wochenschr.* C. A. Ewaldnummer. 1905. S. 14.

Navnlig kan det for den melkekoagulerende ævnes vedkommende tænkes, at denne har gaaet tilspilde ved den før koagulationsforsøgenes udførelse nødvendige neutralisation af den sure mavesaft, idet løpet efter Hammarstens og andres undersøgelser er overordentlig ømfindtligt for selv smaa spor af alkali.

Større værdi maa derimod tilmaales Orla Jensens[1] undersøgelser over den vekslende relation mellem pepsin og løpe, eftersom ekstraktet paa løpemaven tilberedes ved hjælp af rent vand eller kogsaltopløsninger. Disse synes, som ogsaa Orla Jensen selv gjør det, at berettige til den slutning, at løpe og pepsin hverken kan være identiske eller sidekjæder af samme molekyl. Men efter min mening bør man være forsigtig med af rent statistiske undersøgelser over den naturlige forekomst at drage afgjørende slutninger i den ene eller anden retning.

Forholdet vilde være mere oversigtligt, om man fra begyndelsen havde begge virkninger sammen og siden lykkedes at skille dem ad. Det opgir Schrumpf[2] at have opnaaet ved hjælp af cholesterinmetoden, idet han af pressaft fra svinemaver fremstillede et pepsinpræparat, som tiltrods for, at det havde en kraftig fordøiende ævne, ikke kunde udfolde nogen melkekoagulerende virksomhed. Der er imidlertid det aber ved Schrumpfs enzymopløsninger, at de efter kun 3—4 timers forløb mistede sin virkeævne, og de maa derfor ansees mindre bevisende. Da maa de af Hammarsten udførte rensningsforsøg af chymosin fra 1872 være langt sikrere. Ved sin kombinerede magnesiumkarbonatmetode med paafølgende blysukker og stearinsæbefældning lykkedes det Hammarsten af kalvemaven at fremstille et chymosinpræparat, der udøvede en overordentlig kraftig melkekoagulerende virkning ved neutral reaktion, uden at det ved sur reaktion udøvede den mindste fordøiende ævne. Dette præparat maa have været meget rent; thi det gav ikke de almindelige æggehvidereaktioner, og det er efter min mening et af de mest beviskraftige forsøg, som findes, for, at det maa være to forskjellige virkninger.

Vil man derimod stille sig paa det noget søgte standpunkt, at det vistnok er to forskjellige enzymvirkninger, men at disse repræsenteres af sidekjæder i et og samme molekyl, da kan Hammarstens forsøg ikke ansees at bevise noget; thi den ene sidekjæde kan jo tænkes at være gaaet tabt under fremstillingen. Det har ikke lykkedes Pawlow at fremstille rent chymosin efter Hammarstens metode; men hertil er at be-

[1] Orla Jensen: Einige Bemerkungen über Lab und Labbereitung. *Landwirthschaftliches Jahrbuch der Schweiz.* 1907. S.-A.

[2] P. Schrumpf: Darstellung des Pepsinfermentes aus Magenpresssaft. *Hofmeisters Beiträge.* Bd. VI. 1905. S. 396.

mærke, at Hammarsten selv siger, at det heller ikke lykkedes ham i mere end et faatal af de mange forsøg, han gjorde. Videre har Pawlow villet frakjende Hammarstens forsøg enhver beviskraft ved at formode, at hans præparater har indeholdt magnesiumchlorid som forurensning, og at dette skulde være aarsagen til, at en peptisk digestion ikke lod sig paavise, hvilket Hammarsten imidlertid siger ikke var tilfældet. Martin Jacoby[1] har endelig i det sidste aars tid offentliggjort en række af forsøg, hvor han dels har søgt at skille den fordøiende og melkekoagulerende ævne ad, dels har udført forsøg med antienzymer. Han kommer til det ganske negative standpunkt, at det hidtil ikke er lykkedes at skaffe afgjørende beviser for, at løpe- og pepsinvirkningen fremkaldes af to forskjellige molekyler. Til Pawlows opfatning har Sawjalow[2] sluttet sig og rykket i marken med en afhandling, hvor han fornægter, at der overhovedet gives en selvstændig løpevirkning. Det hele er en ren pepsinvirkning, en peptisk digestion eller, som han siger, »eine maskierte Verdauung das Caseins«.

Pawlow har imidlertid ikke nøiet sig med at paavise en parallelitet mellem pepsin- og løpevirkning, men har ogsaa troet sig at have vist noget lignende for pankreassaftens trypsin, idet han har sammenlignet dens koagulationsævne paa med saltsyre tilsat melk med dens æggehvideopløsende ævne ved alkalisk reaktion. Wohlgemuth[3] har med pankreassaft fra menneske gjentaget og bekræftet Pawlows forsøg. Hvis man altsaa vil godkjende den tydning, Pawlow har givet for sine pepsin-løpeundersøgelser, skulde ikke alene pepsin og løpe være identiske, men ogsaa et forhold bestaa til det fra pepsinet i sit kemiske spaltningsarbeide helt forskjellige trypsin. Et spørgsmaal, som sikkerlig er altfor tidlig vakt, idet den af disse forskere valgte forsøgsanordning aldeles ikke er anvendbar, naar det gjælder vidtrækkende teoretiske spørgsmaal. Spørgsmaal, som forøvrigt neppe med held kan optages til diskussion, før vi har noget mere kjendskab til den enkelte enzymvirknings virkelige art og natur, end vi for tiden har. Man kunde efter min mening med lige stor ret formode, at chymosinet var identisk med et hvilketsomhelst af de proteolytiske enzymer, som kan optræde sammen med det; men da kunde man lige godt sløife det som selvstændigt enzym.

[1] Martin Jacoby: Ueber Beziehungen der Verdauungswirkungen und der Labwirkung, samt Zur Kenntnis der Fermente und Antifermente. *Biochemische Zeitschrift.* Bd. I—IV. 1906—07.

[2] W. Sawjalow: Zur Frage nach der Identität von Pepsin und Chymosin. *Hoppe-Seylers Zeitschrift.* Bd. XLVI. 1905. S. 307.

[3] I. Wohlgemuth: Untersuchungen über den Pankreassaft des Menschen. III Mitteilung. *Biochemische Zeitschrift.* Bd. II. 1907. S. 350.

Det yderst mangelfulde kjendskab, vi hidtil har havt over de forandringer, som finder sted ved løpets indvirkning paa kaseinet, foranledigede mig for over 3 aar siden til at paabegynde en undersøgelse herover, for om muligt paa denne vei at vinde en opfatning af den fysiologiske betydning i sin almindelighed eller ogsaa den betydning for fordøielsens kemiske fysiologi, løpet har eller maa antages at have. Jeg maa erkjende, at de undersøgelser, jeg i de følgende sider skal behandle, ikke har ført mig til nogen forstaaelse af løpets fysiologiske betydning. Ei heller er der i den forløbne tid andetstedsfra kommet undersøgelser, der kan være til veiledning ved bedømmelsen af dette spørgsmaal.

Men tiltrods herfor vover jeg dog at tro, at mine undersøgelser har ført et stykke paa vei, forsaavidt som jeg har lykkedes at føre beviser for, at den kemiske proces, som finder sted, bestaar i en eiendommelig hydrolytisk spaltning. Samtidig hermed maatte jeg selvfølgelig ogsaa tage standpunkt til spørgsmaalet, om løpet overhovedet eksisterer som et selvstændigt enzym. Den første del af dette arbeide kommer derfor til at behandle en række undersøgelser, hvormed jeg tror mig med sikkerhed at have vist løpevirkningens selvstændighed, forsaavidt som jeg med negativt resultat har behandlet spørgsmaalet, om pepsin og løpe er identiske enzymer. Spørgsmaalet, om trypsin og løpe staar i nogen forbindelse med hverandre, har jeg som oven nævnt foreløbig anseet det upaakrævet at optage til diskussion, ei heller om der bestaar nogen forbindelse mellem løpe og andre proteolytiske enzymer.

Er løpe og pepsin identiske enzymer?

Som jeg allerede har nævnt, er det ikke tilstrækkeligt bevis for identiteten af pepsin og løpe, at det lykkes at paavise en parallelitet af mængden af de to enzymer i naturligt forekommende substrater. Der maa ogsaa stilles den fordring, at de to virkninger altid skal være parallele. Det maa saaledes ikke være muligt ved et eller andet indgreb at ophæve den ene af de to virkninger, medens den anden blir uforandret.

Ved mine forsøg har jeg netop søgt at fremkalde en saadan forsvinden af den ene egenskab og derved benyttet mig af en gammel iagttagelse af Hammarsten, at en mavesaft gjennem nogle dages ophedning ved legemstemperatur kan gjøres løpefri.

Inden jeg imidlertid gaar over til at referere Hammarstens gamle observationer og de nye undersøgelser, disse foranledigede mig at udføre, vil jeg erindre om, at det helt siden Hammarstens opdagelse af løpeenzymet altid har været alment anerkjendt, at dette enzym udfører sit karakteristiske arbeide, nemlig omdannelsen af kasein i parakasein, ved en for lakmus neutral reaktion, eller, hvis man tager hensyn til melken og dens fosfater, rettest ved en amfoter reaktion. For pepsinets vedkommende derimod er det alment anerkjendt, at det er fuldstændigt uvirksomt paa æggehvidestoffene ved neutral reaktion, altsaa ogsaa paa kaseinopløsninger, idet dette enzym for at kunne udfolde sin æggehvidespaltende virksomhed antages at fordre en sur reaktion eller, korrekt udtrykt, nærværelsen af disponible vandstofioner. Der findes forøvrigt i den ældre literatur (Hammarsten og Courant) angivelser om, at melkekoagulationen, tiltrods for selve løpeenzymets kolossale ømfindtlighed for alkali, dog skal kunne finde sted i en svagt alkalisk melk. Jeg har selv udført en del forsøg herover, men indskrænker mig her til at omtale et forsøg, hvor jeg ved tilsætning af dinatriumfosfat forandrede melkens amfotere reaktion til en alkalisk. Forsøget er sammemstillet i tabel I.

Tabel I.

Melkekoagulation ved alkalisk reaktion.

Forsøgsopløsning:			Forsøgsopløsningens reaktion paa		Koagulationstid	Mysens reaktion paa	
Melk	3.5 %ig Na_2HPO_4	Vand	rødt lakmuspapir	blaat lakmuspapir		rødt lakmuspapir	blaat lakmuspapir
8 cc.	0.0 cc.	2 cc.	+	±	5 min.	+	±
8 —	0.2 —	1.8 —	+	+	ca. 5 —	+	±
8 —	0.5 —	1.5 —	+	+	ca. 8 —	+	±
8 —	1.5 —	0.5 —	+	+	ca. 30 —	+	+
8 —	2.0 —	0.0 —	+	+	360 —	+	

I tabellen er en blaafarvning betegnet med +, tegnet ± betyder, at lakmuspapiret forholder sig som ved befugtning med en draabe destilleret vand. Til disse prøver sattes 0.2 cc. af en og samme løpeopløsning. Det vil sees, at samtlige med fosfat tilsatte prøver fra begyndelsen af har reageret sikkert alkalisk ligeoverfor lakmus, og at iallefald en af prøverne tiltrods for, at der under koagulationsprocessen sker en forskydning af reaktionen mod den sure side, dog efter dennes slutning har vist en for lakmus alkalisk reaktion. I modsætning til, hvad tilfældet er med pepsinet, skulde der saaledes ikke være tvivl om, at løpet kan virke i fuldstændigt fravær af disponible vandstofioner. Jeg medgir, at en undersøgelse af et saa pas vigtigt spørgsmaal skulde fordret en sikrere fastsættelse af reaktionen end ved hjælp af lakmus. Men den besværlige undersøgelse ved hjælp af gaskjæder fandt jeg ikke anledning til at udføre. Og med lakmus kommer man jo forøvrigt erfaringsmæssig det elektrokemisk neutrale punkt saa nære som muligt uden en saadan vidløftig undersøgelse. Mine (i 1906 udførte) undersøgelser [1] er uafhængig af mig blevet bekræftede af M. van Herwerden [2] ved en i sommer udført undersøgelse. Disse enkle undersøgelser maa kunne anvendes som en værdifuld støtte for den opfatning, at pepsin og løpe ikke er identiske enzymer, men de kan dog paa den anden side ikke anvendes som afgjørende bevis.

---

[1] S. Schmidt-Nielsen: Zur Kenntniss des Kaseins und der Labgerinnung. *Upsala Läkareför. Förh.* N. F. Bd. XI. Suppl. 1906. S. 22.

[2] M. van Herwerden: Beitrag zur Kenntnis der Labwirkung auf Casein. *Hoppe-Seylers Zeitschrift.* Bd. LII. 1907. S. 184.

Hvis vi vil opretholde den gamle definition paa løpet, at det skal virke ved neutral reaktion, er det et stort spørgsmaal, om man iddethele-taget skulde behøve at tillægge Pawlows undersøgelser over pepsin og løpe nogen værdi. Sagen er nemlig den, at Pawlow har udført alle sine undersøgelser direkte med den sure mavesaft og saaledes arbeidet med en melkenzymblanding indeholdende flere tiendedels pro mille saltsyre. Man ved jo, at syrer i særdeles høi grad befordrer den enzymatiske melkekoagulation. Med den vekslende mængde tilsat mavesaft faar blandingen en forskjellig aciditet; derved vil ogsaa forøgelsen af koagulationstiden for de forskjellige prøver blive en forskjellig. Det vil altsaa synes, som om det grundlag, Pawlow har havt for sine vidt gaaende slutninger, ikke er i overensstemmelse med de mest elementære fordringer, man burde have ret til at stille. Det maa endvidere erindres, at man har al grund til at antage, at løpe fra forskjellige steder ikke er identiske. Saaledes maa man jo antage, at cynarasen, artiskokkens melkekoagulerende enzym, er helt forskjelligt, idet det ved immuniseringsforsøg gir et paa almindeligt chymosin uvirksomt antienzym, samt at man anser kalvemavens for at være det typiske chymosin, medens Pawlow har udført sine undersøgelser paa hundemavesaft, uden at det hidtil er vist, om hunden har et virkelig typisk chymosin.

Hammarstens[1] iagttagelser over løpets forandring ved ophedning var i korthed den, at en sur mavesaft, der i sin native tilstand efter foregaaende neutralisation koagulerede melk (i forholdet 1 del mavesaft til 5 dele melk) i løbet af nogle minuter, efter nogle dages ophedning til legemstemperatur ikke længere besad ævnen til at koagulere melk, medens den fremdeles var i besiddelse af æggehvideopløsende ævne. Medens altsaa løpet var destrueret, havde pepsinet vist sig mere modstandskraftigt. Men tilsattes paanyt saltsyre til den ophedede, derefter neutraliserede mavesaft, viste det sig, at den kunde koagulere melk, og dette antog Hammarsten var at forklare saa, at pepsinet ved sur reaktion var i besiddelse af en melkekoagulerende ævne. Da der i den tyske literatur om denne iagttagelse ikke findes mere end Hammarstens eget knappe autoreferat i Maly's Jahresbericht[2], hvor han siger: »Obwohl das Pepsin in einer neutralen Flüssigkeit ganz ohne Einfluss auf die Milchgerinnung ist, kann

[1] Olof Hammarsten: Om mjölk-ystningen och de dervid verksamma fermenterna i magslemhinnan. *Upsala Läkareförenings Förhandlingar.* Bd. VIII. (1872—73). S. 8.

[2] *Malys Jahresbericht.* Bd. II (1874). S. 118.

man ihm also in saurer Lösung eine derartige Wirkung nicht ganz absprechen«, er den blevet fuldstændig overseet. Men da den ved Pawlows paastande har faaet aktuel interesse, har det sin interesse at fremdrage, hvad Hammarsten allerede for 35 aar siden iagttog. Hvis det forholder sig saa, som af Hammarsten formodet, nemlig, at pepsin ved sur reaktion virker koagulerende paa melk, da er den af Pawlow iagttagne parallelitet en aldeles selvfølgelig sag, men ogsaa i samme øieblik fuldstændig uanvendbar som et bevis for de to enzymvirkningers identitet.

Ved opvarmning til legemstemperatur siger Hammarsten (l. c. s. 80—82) »förstöres nämligen löpet, under det att pepsinet stannar qvar, och, om en sådan, länge värmd, vätska neutraliseras, kan den stå i flera timmar med mjölk, utan att blandningen löpnar. Göres den neutraliserade, förut värmda, infusionen deremot åter sur till 0.1 % HCl och blandas med mjölk i förhållandet 1 : 5, så löpnar den inom kortare eller längre tid allt efter den olika pepsinhalten i blandningen. Genom att under 48 timmar värma[1] en af saltsyra, 0.25 % HCl, sur infusion på kalfmage förstörde jag sålunda löpet så fullständigt, att blandningen af den neutraliserade infusionen och mjölk löpnade först efter 6 timmars och 10 minuters förlopp. Den värmda, derefter neutraliserade och sedan till 0.1 % HCl surgjorda infusionen delades sedan i 2 prof, af hvilka det ena under ett par timmar värmdes till 80° C., och det visade sig då, att detta sista, värmda, sura prof löpnade mjölk först efter 5 timmar och 33 minuter under det att det ikke värmda sura profvet ystade mjölk på 12 minuter. Häremot invänder kanske någon, att, då löpet verkar kraftigast vid sur reaction, det möjligen icke varit fullständigt förstördt i detta fall, men funnits i så ringa mängd, att det varit overksamt i den neutrala blandningen, men väl kunnat orsaka löpnandet vid sur reaction. Härpå kan dock svaras att, om en mjölkblandning löpnar i värme först efter 6 timmars förlopp, ingenting berättigar till det antagandet, att löpe finnes med. Ännu bättre vederlägges dock denna invändning af det kontrollförsök jag anställde med samma mjölk under i öfrigt samma förhållanden. En ren pepsinfri lösning af löpe[2] utspäddes, tills den neutrala mjölkblandningen ystade sig efter 45 minuters förlopp, derefter gjordes resten af denna utspädda fermentlösning sur till 0.1 % HCl, blandades med mjölk, och denna blandning löpnade på 20 minuter. Sålunda, en pepsinfri löpehaltig vätska, som vid neutral reaction coagulerade mjölk paa 45 minuter, verkade vid sur reaction först efter 20 minuters förlopp. Icke alltid verkar den pepsinhaltiga, sura vät-

[1] Ved legemstemperatur.
[2] Fremstillet ved hjælp af H—ns magnesiummetode. Anm. af forf.

skan lika snabbt, som i det här ofvan omnämnda försöket; vid större pepsinhalt verkar den snabbare, vid mindre långsammare. Vidare verkar pepsinet mycket hastigare vid en högre än vid en lägre syregrad. Man kan blanda 1 vol. surt vatten eller vid hög temperatur värmd infusion af syregraden 0.2 % *HCl* med 5 vol. mjölk, utan att en sådan blandning ystar sig på 2 timmar, men, om man dermed jemför 2:ne prof af samma pepsinhaltiga vätska, det ena af syregraden 0.1 det andra af 0.2 % *HCl*, skall man finna, att båda de senare profven coagulera inom kort tid, men det suraste ojemförligt mycket hastigare än det mindre sura. Alla de försök jag anställt, hafva sålunda visat, att syra och pepsin tillsammans verka kraftigare på mjölk än syra ensam, och man måste sålunda tillskrifva äfven pepsinet en rol vid mjölkystningen, så framt man icke vill antaga, att här är fråga om ett nytt, med pepsinet beslägtadt, ferment, ett antagande som väl kan anses vara öfverflödigt. Men om pepsinet sålunda icke är alldeles overksamt vid mjölkystningen, synes dock denna dess verkan vara af underordnad vigt och framträda tydligare endast vid större fermenthalt hos vätskan eller vid högre syregrader.“

Det er disse iagttagelser, som jeg har taget som udgangspunkt for mine undersøgelser. Jeg ophedede svagt saltsure infusioner paa slim fra spædkalvers løpemave saa længe ved 40°, at infusionen efter en omhyggelig neutralisation med $^{n}/_{10}$ $NaOH$ og lakmus som indikator behøvede en 4 à 6 timer for at koagulere melk, naar der til koagulationsforsøget anvendtes 1 del neutral saft paa 5 dele melk. Denne opvarmede, siden neutraliserede mavesaft med meget liden løpeævne betegner jeg som opløsning *A*. En anden del af den samme sure infusion, der ikke var bleven opvarmet, blev ligeledes neutraliseret med den selvsamme $^{n}/_{10}$ $NaOH$ med lakmus som indikator og derefter fortyndet saa meget, at den under nøiagtig de samme forsøgsbetingelser som anvendt for opløsning *A* koagulerede neutral melk i omtrent lige lang tid som denne. Den saaledes vundne fortyndede infusion betegner jeg som opløsning *B*.

Opløsning *A* og opløsning *B* virker altsaa ved neutral reaktion praktisk talt lige kraftigt paa melk og indeholder derfor, i overensstemmelse med den definition, som er givet for chymosin, lige store mængder af dette enzym. Hvis det nu forholdt sig saa, at vi i mavesaften kun havde at gjøre med et eneste enzym, men som ved neutral reaktion fremkaldte melkekoagulationen, ved sur en æggehvidefordøielse, hvad skulde vi vente, om vi isteden for at studere deres indvirkning paa neutral melk surgjorde opløsningerne og lod de sure opløsninger virke paa melk under fuldstændig ensartede forsøgsbetingelser? Eller jeg lod begge de surgjorte opløsninger virke paa fibrin? Vi maatte selvfølgelig finde, at den

sure melk-enzymblanding i begge tilfælde koaguleredes paa omtrent lige lang tid, og at begge opløsninger fordøiede fibrin med praktisk talt samme hastighed.

Men hvis nu denne forudsætning ikke slog til? Hvis det for eksempel skulde vise sig, at den ene af opløsningerne, f. eks. opløsning *A*, baade fordøiede fibrin kraftigere og koagulerede melken raskere end opløsning *B*, da var det jo ikke længere muligt at tro paa en identitet mellem de to enzymvirkninger; thi det forudsætter, at begge ikke alene fra begyndelsen skal være tilstede i lige udstrækning i de to prøver, men ogsaa forblive det, saafremt der ikke indføres stoflige forandringer, der kan virke hindrende paa selve processen. (Stoflige forandringer udenfra, f. eks. tilførsel af nye stoffe til systemet, er uden betydning saalænge de kun indvirker paa enzymet.) — Men samtidig vilde der ogsaa være leveret et bevis for, at der i disse opløsninger maatte findes et andet melkekoagulerende enzym end løpe, og dette andet melkekoagulerende enzym maatte være virksomt ved sur reaktion.

Efter denne plan har jeg nu anstillet en række forsøg. Før jeg gaar over til at omtale de derved vundne resultater, maa jeg omtale en del af forsøgsdetaljerne. De friske løpemaver fra spædkalv blev forst grundig afvaskede i rindende vand, saaledes at slimhinden var fuldstændig befriet fra alle synlige partikler. Derefter bortskares pylorusdelen og fra fundusdelens folder afskrabedes kjærtelskiktet ved hjælp af et uhrglas. Dette fordeltes i sin 10-dobbelte mængde 5 ⁰/₀₀ saltsyre og fik henstaa paa is natten over. Derefter fortyndedes med lige volumina vand og filtreredes. Den saaledes erholdte mavesaft fortyndedes med lige dele 2.5 ⁰/₀₀ig saltsyre og deltes i to portioner. Hovedportionen ophededes i rugekasse ved en temperatur fra 40—42° C. i løbet af 1 til 3 dage, medens den anden portion, der skulde tjene som kontrol eller sammenligningsprøve, blev forvaret ved 0° C. Af den opvarmede portion udtoges daglig smaaprøver, som efter foregaaende afkjøling neutraliseredes omhyggeligt og derefter undersøgtes paa sin løpeævne. Da denne var bleven tilstrækkelig liden, kunde de egentlige forsøg anstilles. Nu blev saavel den opvarmede portion som den ved 0° C. opbevarede kontrolportion paa nøiagtig den samme maade neutraliseret ved en særdeles omhyggelig titrering med $^{n}/_{10}$ $NaOH$ med lakmus som indikator. Dele af kontrolportionen blev derefter fortyndet saa meget, at de under de selvsamme forsøgsbetingelser koagulerede neutral melk paa lige lang tid som den opvarmede, siden neutraliserede prøve. Paa denne maade erholdtes de oven omtalte forsøgsopløsninger *A* og *B*.

Hvad udførelsen af koagulationsforsøgene angaar, gjør jeg udtrykkelig opmærksom paa, at de i alle serier er udførte paa nøiagtig samme maade. Til hvert forsøg anvendtes 10 cc. melk og 2 cc. enzymopløsning. Melken var fuldstændig fersk, et par timer gammel, uskummet komelk. Forsøgene udførtes paa den maade, at de 2 cc. enzymopløsning afmaaltes i et reagensrør, hvorefter de afmaalte 10 cc. melk tilsattes fra et maaleglas, hvorefter røret lukkedes med en kautschukkork samt rystedes ganske sagte, hvorefter det straks nedsattes i det paa 38—40° C. indstillede vandbad. De til en og samme forsøgsserie hørende prøver sattes igang i rækkefølge med det kortest mulige tidsmellemrum. For hver enkelt prøve noteredes tiden, da røret nedsattes i vandbadet. Enkelte forskere har foretrukket at anvende en til 40° forvarmet melk til koagulationsforsøgene og regner koagulationstiden fra det øieblik, melken tilsættes. Jeg tror, at den af mig anvendte fremgangsmaade, naar man arbeider omhyggeligt, gir fuldstændig lige stor nøiagtighed. Den er desuden behageligere. Som bekjendt surner almindelig melk, naar den faar henstaa ved legemstemperatur, i løbet af en 10—12 timer eller derover. Og ved en tilstrækkelig høi koncentration af de dannede organiske syrer (væsentlig melkesyre) indtræder en spontan koagulation, hvilket ikke har noget med koagulationen med løpe at gjøre, idet det kun dreier sig om en udfældning af uforandret kasein, idet syren berøver det det alkali, som holder det „opløst".

Naar jeg nu ved mine forsøg maa strække koagulationen ud over et tidsrum af 5—6 timer, vil man have ret til at antage, at den af mikrober bevirkede spontane syredannelse, selv om den ikke fører til en udfældning af kaseinet, dog kan have en indflydelse paa de enzymatiske processer, jeg vilde studere. Dette kan ikke bestrides; men paa den anden side vil jo forholdene i parallelprøven (*B*) forandres paa samme maade som i hovedprøven (*A*). Og da det hele kun kan og maa dreie sig om relative værdier, har jeg foretrukket at arbeide med den native melk, istedenfor som enkelte forskere, som f. eks. Pawlow, at holde mikrobevirkning borte ved hjælp af forskjellige antiseptika. Sagen er nemlig den, at de fleste antiseptika foruden paa mikroberne ogsaa kan paavirke enzymerne, og jeg har derfor med flid undgaaet dette.

Koagulationsforsøgene ved sur reaktion er ogsaa udført paa den netop omtalte maade. Istedenfor paanyt at surgjøre de neutraliserede forsøgsopløsninger har jeg foretrukket at fortætte melken med en modsvarende mængde saltsyre (i almindelighed 0.4 ‰ *HCl*), og derefter føiet denne til den i forveien afmaalte neutrale enzymopløsning. Men melk-saltsyreblandingen var tilberedt nogle øieblikke før paabegyndelsen af hver enkelt serie[1]. Ved denne fremgangsmaade faaes de samme værdier, som om enzymopløsningen først surgjordes og koagulationsforsøget derefter udførtes med neutral melk. Naar det som ved mine forsøg gjælder serier af bestemmelser, tror jeg, at nøiagtigheden for hver serie blir større.

Hvad endelig angaar forsøgsopløsningernes æggehvidefordøiende ævne, har jeg fastsat denne ved hjælp af fordøielsesforsøg med karminfibrin fremstillet efter Grützner[2] ved en saltsyregrad af 1 ‰. Til det øiemed indveiedes nøiagtig 1 gram af et med 1 ‰ saltsyre tilberedt, siden mellem filtrerpapir vel udpresset karminfibringelé, som fordeltes i 10 cc. af den neutrale forsøgsopløsning. Denne fortsattes nu med 10 cc. 2 ‰ saltsyre, hvorved fordøielsesforsøget kom til at finde sted ved en syregrad af 1 ‰. Som maal for opløsningernes fordøielsesævne har jeg i almindelighed observeret den tid, som ved værelsestemperatur var nødvendig for at faa den hele fibrinmængde opløst. I enkelte tilfælde har jeg ogsaa fastsat den farveintensitet, som opløsningen havde faaet efter en bestemt tid, ved sammenligning med den Grützner'ske skala.

De efter den omtalte forsøgsanordning[3] vundne resultater er sammenstillet i tabellerne II—VI, der optager forsøg udførte paa 5 forskjellige kunstige mavesaftprøver.

---

1 Ved særskilte forsøg over systemet melk-saltsyre kunde jeg ved frysepunktsbestemmelser forøvrigt vise, at systemet allerede efter faa minuter var i ro.

2 P. Grützner: Neue Untersuchungen über die Bildung und Ausscheidung des Pepsins. *Habilitationsschrift.* Breslau 1875.

3 Cfr. S. Schmidt-Nielsen: Über die vermeintliche Identität von Pepsin und Chymosin. *Hoppe-Seylers Zeitschr.* Bd. XLVIII. 1906. S. 92—109.

Jeg erindrer paanyt om, at med forsøgsopløsning *A* forstaaes den ophedede mavesaft, med *B* den ved fortynding erholdte kontrol- eller sammenligningsprøve. »Neutral melkekoagulation« betegner den forsøgsanordning, hvor løpeævnen fastsættes paa nativ melk med en neutral enzymopløsning, »sur melkekoagulation«, at koagulationsforsøget er udført paa en med 0.4 ⁰/₀₀ *HCl* forsat melk med en neutral enzymopløsning.

Tabel II.

Forsøg med kalvemavesaft nr. 1:

	Opløsning *A*:	Opløsning *B*:
Neutral melkekoagulation	370 min.	355 min.
Sur —»—	6 —	215 —
Pepsinfordøielse	3 timer	80 timer.

Tabel III.

Forsøg med kalvemavesaft nr. 2:

	Opløsning *A*:	Opløsning *B*:
Neutral melkekoagulation	420 min.	360 min.
Sur —»—	18 —	250 —
Pepsinfordøielse	3—4 timer	80 timer

Tabel IV.

Forsøg med kalvemavesaft nr. 3:

	Opløsning *A*:	Opløsning *B*:
Neutral melkekoagulation	300 min.	300 min.
Sur —»—	5 —	200 —
Pepsinfordøielse	2 timer	30 timer

Tabel V.

Forsøg med kalvemavesaft nr. 4:

	Opløsning *A*:	Opløsning *B*:
Neutral melkekoagulation	300 min.	220 min.
Sur —»—	10 —	25 —
Pepsinfordøielse	2 timer	36 timer

Tabel VI.

Forsøg med kalvemavesaft nr. 5:

	Oplosning *A*:	Oplosning *B*:
Neutral melkekoagulation	280 min.	300 min.
Sur —»—	10 —	45 —
Pepsinfordoielse	5 timer	75—80 timer

Foruden disse fuldstændige forsøg har jeg i tabellerne VII og VIII sammenstillet tvende forsøg, der er udført med samme mavesaft som i forsøget tabel nr. II, men med andre fortyndingsforholde og en anden melk.

Tabel VII.

Forsøg med kalvemavesaft nr. 1:

	Opløsning *A*:	Opløsning *B*:
Neutral melkekoagulation	300 min.	165 min.
Sur —»—	8 —	40 —

Tabel VIII.

Forsøg med kalvemavesaft nr. 1:

	Opløsning *A*:	Opløsning *B*:
Neutral melkekoagulation	250 min.	270 min.
Sur —»—	8½ —	180 —

I samtlige disse som i en række af andre lignende forsøg, som jeg anser det overflødigt at gjengive, har jeg nu altid fundet det samme resultat nemlig, som det med stor tydelighed fremgaar af tabellerne, at opløsning *A* tiltrods for, at den ved neutral reaktion viser den samme[1] eller en mindre koagulationsævne end opløsning *B*, dog besidder en ganske anderledes kraftig koagulationsævne end *B*, naar forsøget udføres ved sur reaktion, og at opløsning *A* ogsaa stadig viser en betydelig kraftigere æggehvidefordøiende ævne.

Mange vil kanske anse disse forsøg mindre beviskraftige, fordi koagulationsforsøgene ved neutral reaktion har strukket sig over et saapas langt

[1] Hertil regner jeg ogsaa forsøgene i tabel VI og VIII tiltrods for, at *A* her udøvede en lidt kraftigere virkning.

tidsrum, at man kunde befrygte, at jeg overhovedet ikke havde en enzymvirkning, men en spontan syrekoagulation, idet jeg, som i forsøgsanordningen nævnt, undlod at forsætte melken med antiseptika. Dette er imidlertid sikkert ikke tilfældet, idet der ved alle koagulationsforsøg altid blev anstillet parallele kontrolforsøg, hvor en nativ eller med saltsyre tilsat melk behandledes med enzymopløsningen i kogt tilstand under nøiagtig de samme forsøgsbetingelser som hovedprøven. Det viste sig altid, at blindprøven først koaguleredes flere timer senere end den enzymholdige hovedprøve, at det med andre ord altid har været en enzymatisk koagulation, der er registreret i forsøgene.

Tiltrods for dette vil man kunne indvende, at der ikke ved ophedningen er bevirket en destruktion af det ved neutral reaktion melk koagulerende enzym, men at der isteden ved ophedningen er dannet antilegemer, som gav anledning til de fundne resultater. Man kunde nemlig, om man forudsatte, at pepsinet virkelig var det enzym, som ved neutral reaktion koagulerede melken, tænke sig, at de eventuelt ved ophedningen dannede antilegemer kun var virksomme ved neutral reaktion, at med andre ord forbindelsen enzym-antilegeme dissosieredes ved sur reaktion, og at de eventuelt nydannede antilegemer saaledes hverken forhindrede pepsinfordøielsen eller den sure melkekoagulation, medens de bragte den neutrale melkekoagulationsævne hos mavesaften til tilsyneladende at forsvinde. Denne antagelse kunde synes saa meget mere plausibel, som Schwarz[1] har troet sig at kunne vise, at der ved ophedning af maveinfusioner dannes antipepsin. Ihvorvel jeg føler mig alt andet end overbevist om rigtigheden af Schwarz's forsøg, fandt jeg mig ikke opfordret til ved denne anledning at gjøre en speciel undersøgelse herover; men denne mulighed maatte dog prøves ved nogle forsøg, hvoraf jeg meddeler et par.

Forsøg nr. IX: Af en kraftigt virkende, ikke opvarmet, neutraliseret kalvemaveinfusion blev en portion fortyndet med sit 8-dobbelte volum af en ophedet (altsaa løpefattig) siden neutraliseret infusion, medens en anden portion blev fortyndet med en kogsaltopløsning af tilsvarende styrke. Med disse tvende opløsninger anstilledes koagulationsforsøg paa neutral melk paa vanlig maade øieblikkelig efter blandingen. Det viste sig, at de havde en koagulationstid af henholdsvis 18 og 14 minuter, saaledes en ringe forskjel. For at se, om den eventuelle antivirkning behøvede nogen tid for at gjøre sig gjældende, undersøgtes blandingernes koagulationsævne paanyt efter henholdsvis ½ time og 24 timer. Koagulationstiderne var fremdeles de samme, nemlig henholdsvis 18 og 14 minuter.

[1] Osw. Schwarz: Zur Kenntniss der Antipepsine. *Hofmeisters Beiträge.* Bd. VI. 1905. S. 524.

Forsøg nr. X: Dette forsøg udførtes paa nøiagtig den samme maade som ovenstaaende forsøg IX, men med anden mavesaft og anden melk. Straks efter blandingen var koagulationstiderne for begge prøver 11 minuter og efter 24 timers henstand for begge prøver 10 minuter.

Det vil heraf indsees, at den betydelige forlængelse af løpetiden ved neutral reaktion for de ophedede mavesaftprøver ikke kan fremkaldes derved, at der ved ophedningen dannes antilegemer.

Men dermed er det dog ikke bevist, at løpet er tilintetgjort. Den mulighed er ikke uden videre udelukket, at løpet er overført i en ny modifikation, der ikke kan udfolde sin melk koagulerende ævne ved neutral reaktion. Jeg skal længere ned komme tilbage til denne mulighed.

Men for det spørgsmaal, som her i første række interesserer os, er det aldeles ligegyldigt, om løpet er destrueret, eller om det er overført i en ny modifikation, med nye egenskaber.

Det, som for det spørgsmaal, jeg maatte stille mig, nemlig om pepsin og løpe er identiske enzymer, er det afgjørende, var, om der eksisterede en parallelitet mellem den melkekoagulerende ævne ved neutral reaktion og den æggehvidefordøiende ved sur reaktion. Af tabellerne vil det til fuld evidens fremgaa, at der ikke eksisterer nogen parallelitet mellem »neutral melkekoagulation« og »pepsinfordøielse« for henholdsvis opløsning *A* og opløsning *B*. Der maa med andre ord være to forskjellige enzymvirkninger. Jeg anser mig derfor berettiget til at slutte: Det enzym, der koagulerer neutral melk, chymosin, kan ikke være identisk med pepsin.

Naar det af tabellerne II—VIII fremgaar, at enzymopløsninger, der ved neutral reaktion har omtrent samme løpeævne, ved sur reaktion viser sig saa aldeles forskjellige, saa er det indlysende, at der maa findes mere end et melkekoagulerende enzym i disse opløsninger.

Man har følgende muligheder: enten er løpet omdannet i en ny modifikation, der kun virker ved sur reaktion, eller ogsaa virker pepsinet eller et tredie hidtil ukjendt enzym koagulerende paa melk ved sur reaktion. Denne sidste mulighed kan først da tages op til diskussion, naar de to første er helt udelukkede.

Hvad den første mulighed angaar, ligger det nærmest for haanden at tænke paa Bang's parachymosin[1], idet dettes virkning i en ganske spe-

[1] Ivar Bang: Über Parachymosin, ein neues Labferment. *Pflügers Archiv.* Bd. LXXIX. 1900. S. 425.

ciel grad befordres i nærvær af smaa mængder klorcalcium, og dette stof maa dannes i melken ved tilsætning af saltsyre. Da som sagt en af de mest karakteristiske kjendetegn for parachymosin er, at det virker let og kraftigt paa neutral melk efter tilsætning af kalksalte, har jeg for at prøve muligheden af, om parachymosin kunde være dannet, istedenfor at neutralisere de opvarmede mavesaftprøver med $^{n}/_{10}$ $NaOH$ neutraliseret dem med calciumkarbonat. Naar jeg anvendte de saaledes neutraliserede opløsninger til melkekoagulationsforsøg ved neutral reaktion i forholdet 1 : 5, viste det sig, at en koagulation selv ved 38° først indtraadte efter flere timers forløb. I andre forsøg arbeidede jeg med paa vanlig maade med natronlud neutraliseret ophedet mavesaft, men tilsatte 1 °/oo $CaCl_2$ til melken. Tiltrods for dette, der efter Bang skal virke særdeles kraftigt befordrende paa parachymosinet, fandt der ingen væsentligere forøgelse af koagulationstiden sted, idet denne fremdeles var flere timer. Mine iagttagelser taler saaledes imod, at der ved ophedning til legemstemperatur sker en omdannelse af chymosin til parachymosin.

Hvorvidt det tiltrods herfor kan være saa, at chymosinet er omdannet i en ny modifikation, der kun virker ved sur reaktion, eller om der skulde findes et tredie hidtil ubekjendt proteolytisk enzym i maveinfusionerne, staar i et saa nære forhold til spørgsmaalet, om pepsinet ved sur reaktion udøver en melkekoagulerende virksomhed, at dette spørgsmaal egentlig kun kan gjøres til formaal for specielle undersøgelser, naar det er afgjort, at en pepsinvirkning er udelukket.

Hvis det var saa, at pepsinet var det ved den sure melkekoagulation udslaggivende enzym, maatte der med saa løpefattige opløsninger som de, hvormed jeg har arbeidet, eksistere en tydelig parallelitet mellem denne og pepsinfordøielsen. De i tabellerne III—VI meddelte data kan ikke give sikre oplysninger herom, idet der til de forskjellige serier har været anvendt en forskjellig melk og delvis ogsaa et forskjelligt karminfibrin, hvorfor de ikke gjensidig kan sammenlignes. Jeg har derfor anstillet specielle forsøg for at afgjøre, om der eksisterer en parallelitet mellem fibrinfordøielse og sur melkekoagulation. Imidlertid har jeg ikke saa mange forsøg herover, at jeg anser mig berettiget til at drage nogensomhelst bestemt slutning. Den metodik, som maa anvendes, er derhos temmelig usikker. Jeg anfører derfor ingen forsøgsdata, men nøier mig med at anføre, at det ikke har lykkedes mig at vise, at pepsinet i fravær af chymosin enten alene eller sammen med et hidtil ukjendt enzym bevirker den »sure melkekoagulation«. Det spørgsmaal er jo forøvrigt af underordnet betydning for vort hovedspørgsmaal.

For det almindelige løpe, som det typisk erholdes fra kalvemaven, er det karakteristisk, at koagulationstiden ved neutral reaktion fordobles, naar enzymmængden aftager til det halve, at med andre ord produktet af enzymkoncentration og koagulationstid er konstant. Denne lov har vist sig at gjælde saavel for korte koagulationstider f. eks. nogle faa minuter som for flere timer lange koagulationstider.

Hvorledes »løpningsloven« eller løpets tidslov forholder sig ved sur reaktion, er saavidt mig bekjendt hidtil ikke undersøgt. Det er jo ogsaa en særdeles vanskelig undersøgelse, idet den med nødvendighed fordrer et rent chymosinpræparat. Det enzym eller den blanding af enzymer, som findes i mavesaften, og som gir anledning til den sure koagulation, lader sig lettere undersøge i denne henseende, idet det typiske løpe fjærnes ved ophedning til legemstemperatur.

Jeg har gjort nogle forsøg med opvarmede mavesaftprøver for at faa et indblik i den virkningslov, de følger. Koagulationstiden bestemtes ved 38—40° C. med 10 cc. melk og 2 cc. enzymopløsning efter den ovenfor s. 13 beskrevne forsøgsanordning. For at gjøre forsøgsbetingelserne mest muligt lige blev kogt, neutraliseret mavesaft anvendt istedenfor vand som fortyndingsvædske.

Tabel IX.

Forsøg over enzymkoncentrationens indflydelse ved *sur* reaktion:

Melk tilsat 0.3 ‰ saltsyre cc.	Opvarmet siden neutraliseret maveinfusion cc.	Kogt (neutral) maveinfusion cc.	Enzymkoncentration = c.	Koagulationstid = t.	c . t.
10	2	0	1	23 min.	23 = 1
10	1	1	0.5	135 —	67 = 3
10	0.5	1.5	0.25	ubestembar	—

Tabel X.

Forsøg over enzymkoncentrationens indflydelse ved *sur* reaktion:

Melk tilsat 0.3 ‰ saltsyre cc.	Opvarmet siden neutraliseret maveinfusion cc.	Kogt (neutral) maveinfusion cc.	Enzymkoncentration = c.	Koagulationstid = t.	c . t.
10	2	0	1	9½ min.	9½ = 1
10	1	1	0.5	35 —	17½ = 2
10	0.5	1.5	0.25	ca. 300 —	75 = 8

Disse to forsøg viser, at den tidslov, som gjælder for løpe ved neutral reaktion, ikke gjælder for den sure melkekoagulation, hvad enten den nu fremkommer ved en virkning af pepsin, forandret chymosin eller et nyt enzym.

Men da man ikke kjender, hvorledes rent chymosin virker ved sur reaktion, kan jo denne forskjellighed ikke anvendes som et bevis for pepsin og chymosins ikke-identitet.

Efterat jeg i det foregaaende har vist, at pepsin og løpe ikke er identiske enzymer, og at der ved sur reaktion ved siden af løpet optræder et andet enzym (eller enzymblanding), som iethvertfald ved sur reaktion følger andre love end det almindelige løpe, er det nødvendigt at fæste opmærksomheden paa en praktisk konsekvens.

Der er af flere forskere, som f. eks. Becker[1], foreslaaet at skjærpe ømfindtligheden af løpeprøven ved at surgjøre melken med 2 cc. normalsaltsyre pr. 100 cc. melk, d. v. s. en melk med 0.7 °/oo *HCl*. Denne fremgangsmaade er naturligvis aldeles utilladelig ved enhver undersøgelse, hvor man søger efter løpe alene, idet man ved sur reaktion som oven vist faar en samvirken af mindst to forskjellige enzymer. Og naar man erindrer sig, at det fra begyndelsen af som et elementært krav for løpet har været fremholdt, at det er et ved neutral reaktion virkende enzym, maa det forbause, at forskere som Fuld og Blum[2], Blum og Boehme[3] samt Martin Jacoby[4] udfører sine koagulationsforsøg med ikke neutraliserede mavesaftprøver eller sur melk, tiltrods for at de ogsaa har berørt spørgsmaalet om de to enzymers identitet. I dette tilfælde maa det være absolut utilladeligt at anvende surgjort melk eller en sur mavesaft; thi selv om denne er meget lidet sur, vil det dog være en feilkilde.

Anderledes stiller forholdet sig derimod, naar det gjælder at gjøre en rent klinisk undersøgelse; men man maa da erindre sig, at undersøgelsen ikke alene omfatter virkeligt løpe, men at man anvender prøven som en indikator paa, om der overhovedet findes proteolytiske maveenzymer. Her-

[1] G. Becker: Untersuchungen über das Zeitgesetz des menschlichen Labfermentes und dessen quantitative Bestimmung. *Hofmeisters Beiträge*. Bd. VII. 1905. S. 89.

[2] E. Fuld u. L. Blum: Über eine neue Methode der Labbestimmung und über das Verhalten des menschlichen Magenlabs unter normalen und pathologischen Zuständen. *Berliner klinische Wochenschrift*. 1905. Ewaldnummer.

[3] L. Blum u. W. Boehme: Ueber das Verhalten des Labfermentes bei Hunden mit Pawlowschem Nebenmagen. *Hofmeisters Beiträge*. Bd. IX. 1907. S. 74.

[4] Martin Jacoby: Afhandlinger i *Biochemische Zeitschrift*. Bd. I (1906) og Bd. IV (1907).

under maa man ogsaa være opmærksom paa, at selv meget smaa syremængder har en særdeles stor indflydelse, som det fremgaar af tabel XI og XII.

Tabel XI.

Forsøg over *saltsyrens indflydelse* paa den sure melkekoagulation:

Melk cc.	1 $^0/_0$ig saltsyre cc.	Vand cc.	Enzymopløsning cc.	Beregnet saltsyregehalt i blandingen $^0/_{00}$.	Koagulationstid i minuter.
9	0.5	0.5	2	ca. 0.42	$3\frac{1}{2}$
9	0.4	0.6	2	„ 0.33	5
9	0.3	0.7	2	„ 0.25	10
9	0.2	0.8	2	„ 0.17	42
9	0.1	0.9	2	„ 0.08	280
9	0.0	1.0	2	„ 0.00	ubestembar

Tabel XII.

Forsøg over *saltsyrens indflydelse* paa den sure melkekoagulation:

Melk cc.	1 $^0/_0$ig saltsyre cc.	Vand cc.	Enzymopløsning cc.	Beregnet saltsyregehalt i blandingen $^0/_{00}$.	Koagulationstid i minuter.
9	0.5	0.5	2	ca. 0.42	ca. $2\frac{1}{2}$
9	0.4	0.6	2	„ 0.33	„ 3
9	0.3	0.7	2	„ 0.25	„ $4\frac{1}{2}$
9	0.2	0.8	2	„ 0.17	9
9	0.1	0.9	2	„ 0.08	75
9	0.0	1.0	2	„ 0.00	300

Man ser af disse forsøg, der er udførte med opvarmede, siden neutraliserede maveinfusioner, at en gehalt af kun 0.1 til 0.2 $^0/_{00}$ saltsyre i blandingen har været tilstrækkelig til fuldstændig at forandre koagulationstiden. Det er selvsagt, at denne hastighedsforandring ikke altid er den samme, men vekslende for de forskjellige melkeprøver og enzymopløsninger.

Jeg har aldrig gaaet høiere end til 0.4 $^0/_{00}$ saltsyre i blandingen; men jeg finder da, at enzymopløsninger, som ved neutral reaktion skulde vise sig nærmest løpefrie, gir indtryk af at være særdeles enzymrige. Naar man, som foreslaaet af Becker, anvender hele 0.7 $^0/_{00}$, er det indlysende, at medmindre man tager særligt hensyn til dette punkt, vil man kunne gjøre aldeles feilagtige slutninger. Det turde være et spørgsmaal, om ikke koagulationsprøven som indikator paa en forekomst af proteolytiske enzymer i sin almindelighed selv ved en saa ringe syregrad som 0.4 $^0/_{00}$ blir altfor ømfindtlig for kliniske øiemed.

Hvori bestaar løpets indvirkning paa kaseinmolekylet?

I foregaaende afsnit har jeg gaaet ud fra, at det kemiske arbeide, som løpeenzymet bevirker, er en omdannelse af kasein til parakasein. Den, som har vist os dette, er løpeenzymets opdager Olof Hammarsten.

Hammarsten[1] iagttog, at naar han behandlede vandklare neutrale opløsninger af kasein i fortyndet alkali med løpe, fandt der tilsyneladende ingensomhelst forandring sted. Vædsken var lige klar efter som før forsøgets begyndelse. Men tog han efter at have dræbt det tilsatte enzym ved ophedning og satte klorcalcium til opløsningen, viste det sig, at opløsningen fuldstændig havde forandret sine egenskaber. Medens han ved at tilsætte klorcalcium til 0.1 % til en med kogt løpe behandlet kaseinopløsning ikke fik nogen fældning, fik han, naar den samme klorcalciummængde sattes til den først med nativt løpe behandlede, siden kogte kaseinopløsning, en rigelig fældning, der ved en passende koncentration optraadte som en stiv masse.

Det var hermed bevist, at den synlige koagulation, hvilken man naturligvis maatte opfatte som det for løpevirkningen karakteristiske, egentlig kun var en sekundær og ligegyldig foreteelse.

Selve løpets kemiske arbeide var at overføre kaseinet i et nyt stof med helt andre fældningsforholde end det oprindelige kasein. Og dette arbeide foregik fuldstændig uafhængig af kalksaltene. Disse sidste var kun nødvendige, for at man kunde se den indtraadte forandring.

Hvori bestaar nu parakaseindannelsen? Hammarsten[2] fremholdt allerede fra begyndelsen af, at ihvorvel kaseinet overførtes i en lettere fældbar modifikation, »veta vi derföre ej mycket mera om sjelfva förloppet, vi känna ej, om osten t. ex. är en isomer omvandlingsprodukt af caseinet, om den är en klyfningsprodukt o. s. v.«

Tiltrods for at der siden i en menneskealder er udført en stor række af undersøgelser over parakaseinet, har vi endnu paa langt nær faaet nogen klarhed herover. Sagen er nemlig den, at man bortseet fra parakaseinets lettere fældbarhed for klorcalcium hverken i dets elementære sammensætning eller i dets kemiske og fysikalske egenskaber har lykkedes

[1] Olof Hammarsten: Om det chemiska förloppet vid caseinets coagulation med löpe. *Upsala Läkareförenings Förhandlingar.* Bd. 9. (1873—74). S. 363.
[2] L. c. S. 472.

at paavise saadanne forskjelligheder, at de har kunnet give noget vink om arten af løpeenzymets forandring af kaseinmolekylet.

Det eneste, man har havt og fremdeles har at holde sig til, er, at der samtidig med parakaseindannelsen efter Hammarsten optræder et albumoselignende æggehvidestof, som han kaldte myseæggehvide. Om denne Hammarstens iagttagelse fra 1873—74 har der i aarenes løb været ført særdeles megen strid. Det har af enkelte forskere til og med været bestridt, at der ved løpningen optraadte et nyt æggehvidestof ved siden af parakaseinet.

Hvis man læser igjennem Hammarstens svenske originalarbeide (l. c. s. 477—478) og hans assistent Köster's[1] senere arbeide, vil man utvivlsomt finde, at Hammarstens forsøg er overbevisende. Hans angivelser er ogsaa blevet bekræftet af senere forskere, jeg nævner saaledes P. Th. Müller[2]. Den, som navnlig har opponeret imod dannelsen af en myseæggehvide, er Duclaux[3], som ikke kunde paavise, at mængden af opløselig, gjennem lerceller filtrerbar æggehvide tiltog under løpningsprocessen.

Men selv om man fandt, at der optraadte et nyt æggehvidestof under løpningsprocessen, var det dermed ikke vist, at det stod i en direkte forbindelse med parakaseindannelsen. Det kunde godt være et ligegyldigt bifænomen. Vi har i de sidste 30 aar faaet vide svært lidet om myseæggehviden og de betingelser, hvorunder den dannes. Vi har saa at sige indtil de to sidste aar kun havt Hammarsten og Köster's gamle arbeider at holde os til.

Mod den anskuelse, at myseæggehviden afspaltedes af kaseinmolekylet samtidig med parakaseindannelsen, har man navnlig villet indvende, og det uden at kjende, i hvor stor mængde myseæggehviden dannes, at dens mængde er for liden til at udgjøre den anden hydrolytiske spaltningskomponent af kaseinmolekylet. Til denne opfatning har blandt andet Fuld[4] sluttet sig, idet han 1902 fandt, at mysen, dermed altsaa ogsaa myseæggehviden, ikke udøvede nogen hæmmende indflydelse paa koagulationshastigheden, modsat hvad der ellers er kjendt om enzymernes opløselige spaltningsprodukter. Efter dette skulde man antage, at myseæggehviden ikke var et produkt af selve løpeenzymets virksomhed, men et bifænomen.

[1] Hugo Köster: Några bidrag till kännedomen om kaseinet och dess koagulation med löpe. *Upsala Läkareförenings Förhandlingar.* Bd. 16. (1880—81). S. 514.

[2] P. Th. Müller: Vergleichende Studien über die Gerinnung des Kaseins durch Lab und Laktoserum. *Archiv f. Hygiene.* Bd. 44 (1903). S. 126.

[3] E. Duclaux: Sur le lait. *Extrait des annales de l'institut national agronomique.* Tome VIII. 1884. Cfr. Traité de microbiologie. Tome II. Paris 1899.

[4] E. Fuld: Ueber die Milchgerinnung durch Lab. *Hofmeisters Beiträge.* Bd. 2. (1902). S. 169.

Hvis saa var tilfældet, saa havde man to muligheder at forklare sig dannelsen af myseæggehvide paa: 1) enten er myseæggehviden en forurensning, som hænger fast ved kaseinmolekylet, eller ogsaa er det 2) dannet ved hjælp af et eller flere proteolytiske enzymer, som følger med løpet som en forurensning. Ved at afgjøre disse tvende spørgsmaal vil man indirekte vise, hvorvidt myseæggehviden staar i direkte forbindelse med parakaseindannelsen, og man vil derved være kommen et, omend lidet, skridt nærmere forstaaelsen af parakaseindannelsens natur.

Det var disse tvende opgaver, jeg havde sat mig, da jeg i slutningen af aaret 1903 begyndte at orientere mig over løpningsprocessens kemi. I den tid jeg har været beskjæftiget hermed, er der fra udenlandske forskere fremkommet nogle nye undersøgelser over dette og nærliggende spørgsmaal. Jeg skal længere nede referere disse i forbindelse med mine egne undersøgelser. Det er forøvrigt ganske mærkværdigt, at efter en aarrækkes taushed er der pludselig i det sidste aars tid fra flere forskjellige af hinanden helt uafhængige hold fremkommet arbeider over myseæggehvidespørgsmaalet. Dette maa vel tages som et bevis for, at det er et spørgsmaal af stor teoretisk interesse.

Mit første forsøg var at gjentage det gamle Hammarsten'ske myseæggehvideforsøg: En portion af neutral natriumkaseinatopløsning tilsattes en ringe mængde af en kogt løpeopløsning, en anden samme mængde nativ løpe. Begge behandledes derefter 5 à 10 minuter ved legemstemperatur, hvorpaa enzymet blev ødelagt ved en rask ophedning til 90° C. — Efter foregaaende afkjøling til værelsestemperatur blev begge prøver mættet med ordinært kogsalt ved rivning med et ringe overskud heraf i en porcellænsmorter. Efter filtrering kunde jeg i lighed med Hammarsten ved hjælp af eddikesyre og garvesyre og fortynding med vand vise, at der i den med nativ løpe behandlede prøve udfældtes et æggehvidestof, som ikke lod sig paavise i den med kogt løpe behandlede prøve. Dette er Hammarstens myseæggehvide. Man vil indse, at denne paavisning af myseæggehviden staar og falder med mætningen med kogsalt, om det er en procedure, der udfælder ethvert spor af kasein.

Hammarsten selv har gjort opmærksom paa, at det for at kunne udsalte kaseinet er en nødvendig betingelse at anvende et kalkholdigt kogsalt, og ved senere i hans laboratorium af Sebelien[1] udførte under-

[1] John Sebelien: Studien über die analytische Bestimmungsweise der Eiweisskörper mit besonderer Rücksicht auf die Milch. *Hoppe-Seylers Zeitschr.* Bd. 13. (1889). S. 135.

søgelser vistes, at udsaltningen af kasein med kalkholdigt kogsalt var saa fuldstændig, at der efterpaa ikke kunde paavises kvælstof i filtratet ved en garvesyrefældning. Da der imidlertid ikke foreligger nærmere oplysninger om forholdene ved denne udsaltning og denne proces er af fundamental betydning for myseæggehvidespørgsmaalet og idetheletaget hvor det gjælder at skille kaseinet fra dets nærmeste omdannelsesprodukter, har jeg optaget den til detaljeret undersøgelse. Navnlig havde det ogsaa sin store interesse at faa vide noget om, i hvilken udstrækning udsaltningen var afhængig af de opløselige kalksaltes (respektive øvrige jordalkaliers) mængde.

Der var saa meget større opfordring hertil, som Raudnitz i sin kompilation »Die Bestandteile der Milch«[1] efter at have refereret undersøgelser af Arthus, Bechamp, Hewlett, Sebelien, Söldner siger, at »ob Kochsalzsättigung bei Zimmertemperatur die Kaseinsalze vollkommen ausfällt, scheint mir nicht sichergestellt zu sein«.

Da for myseæggehvidespørgsmaalet parakaseinets udsaltning frembyder mindst lige saa stor interesse som kaseinets, var det klart, at jeg maatte undersøge begge stoffes forhold.

Kaseinets forhold ved kogsaltmætning.

Til disse forsøg har jeg dels anvendt et kasein fremstillet efter Hammarstens metode fra firmaet Merck i Darmstadt, dels et saadant præparat, som jeg selv fremstillede af nysilet melk. Det sidstnævnte præparat var fremstillet nøiagtig efter Hammarstens forskrift og renset 5 à 6 gange ved at opløses i meget fortyndet alkali, udfældning med mindst muligt overskud af eddikesyre, udvaskning med destilleret vand samt efter den sidste udfældning desuden en rask udvaskning med alkohol og æter. Af det lufttørre kaseinpræparat tilberedtes opløsningerne ved at sætte den til for lakmus neutral reaktion beregnede $^{n}/_{10}$ natronludmængde til den nøiagtigt indveiede kaseinmængde.

Opløsningerne indeholdt altid 2 gr. kasein i 100 cc. Ved mætning med kemisk rent klornatrium viste det sig for det Merck'ske præparats vedkommende, at der opstod en melket blakning, der efterhaanden samlede sig til en liden fældning. Ved de af mine egne kaseinpræparater fremstillede kaseinatopløsninger fremkom der derimod hverken nogen opalesens, blakning eller fældning. Opløsningerne var saavel straks som efter længere tids forløb fuldstændig vandklare. Da jeg nu har fremstillet 10 for-

[1] R. W. Raudnitz: Die Bestandteile der Milch, ihre Eigenschaften und Veränderungen. *Spiro-Asher's Ergebnisse der Physiologie.* Jahrg. II. Abth. 2. 1903. S. 193.

skjellige kaseinpræparater og altid faaet det samme resultat, anser jeg mig berettiget til at slutte, at virkelig rene natriumkaseinatopløsninger overhovedet ikke fældes af klornatrium.

Paa den anden side kan man med lethed overbevise sig om, at rene 2 % natriumkaseinatopløsninger fældes fuldstændigt ved mætning med ordinært kogsalt med ca. 0.4 % *Ca*, væsentlig som klorid, samt 0.05 % *Mg*. Det lykkes hverken at faa en antydning til den Heller'ske æggehvidereaktion eller ved tilsætning af eddikesyre til 0.1 eller 0.2 % til det saltmættede filtrat at frembringe spor af blakning eller fældning — og dette er jo særdeles skarpe reaktioner. At filtratet virkelig er æggehvidefrit, fremgaar ogsaa af kvælstofbestemmelser efter Kjeldahl. I 50 cc. lykkes det ikke med sikkerhed at paavise kvælstof, idet der aldrig forbruges mere end 0.1 cc. $^{n}/_{10}$ svovlsyre, og det er jo forbrug, der ligger indenfor feilgrændserne.

For nu at kunne fastsætte den mængde klorcalcium, som fordres for at tilveiebringe en fuldstændig udsaltning, har jeg tilsat portioner af en 2 %ig natriumkaseinatopløsning med varierende mængde af dette salt og derefter ved rivning i riveskaal mættet med klornatrium. Mætningsprocessen afsluttedes altid først efter flere timers forløb, og filtreringen fandt altid sted umiddelbart efter den sidste rivning. Hvorvidt der i filtratet fandtes ikke udsaltet kasein eller ikke, afgjordes enten ved hjælp af den Heller'ske æggehvidereaktion, betegnet med »Heller« i forsøgstabellerne, eller ogsaa ved tilsætning af med klornatrium mættet eddikesyre til 0.1 eller 0.2 %, i forsøgstabellerne betegnet med »eddikesyre«.

Prøverne betragtedes kun i det tilfælde som negative, naar der efter 24 timers henstand ikke kunde iagttages et spor af fældning. Hvis prøverne bedømmes tidligere, maa grændsen for fuldstændig fældning drages ved en lavere gehalt af calcium, end virkelig tilfældet er.

Som det vil fremgaa af det forsøg med klorcalcium, som findes i tabel XIII, er det nødvendigt at tilføie 3 volumprocent af en molekylarnormal klorcalciumopløsning (med 11.1 % $CaCl_2$) for at faa fuldstændig fældning, det vil sige, at blandingen maa indeholde 0.33 % $CaCl_2$ (= 0.13 % *Ca*). Hvis man gaar ud fra den (forøvrigt urigtige) forudsætning, at alt calcium bindes af kaseinet, vilde det modsvare en calciumgehalt hos det udsaltede kaseinat af 6.5 % *Ca*. Imidlertid er det udsaltede kaseinats calciumgehalt lavere, idet der altid maa blive klorcalcium igjen i opløsning. Fældningen kan nemlig kun bestaa, naar der findes et overskud af *Ca*-ioner. Forsøger man at udvaske den udsaltede kaseinkalkfældning ved hjælp af en mættet klornatriumopløsning, viser det sig, at

fældningen gaar i opløsning. Det var mig derfor ikke muligt at faa isoleret og analyseret den udfældte kasein-kalk-forbindelse.

Tabel XIII.

Natriumkaseinat-klorcalcium-forsøg:

Forsøgsopløsning: 2 $^0/_0$ig neutral natrium-kaseinatopløsning	normal klorcalciumopløsning	vand	Ved mætning med klornatrium bevirkes fældning		I filtratet blev kasein paavist ved „eddikesyre“ til 0.1 $^0/_0$	„eddikesyre“ til 0.2 $^0/_0$	„Heller“
9 cc.	0.10 cc.	0.90 cc.	+		+	+	+
9 —	0.15 —	0.85 —	+		+	+	+
9 —	0.20 —	0.80 —	+	Let filtrerbar. Klart filtrat.	+	+	+
9 —	0.25 —	0.75 —	+		?	+	+
9 —	0.30 —	0.70 —	+		?	—	?
9 —	0.35 —	0.65 —	+		—	—	—

Et for lakmus neutralt reagerende calciumkaseinat lader sig ikke direkte udsalte, et forsøg, som jeg har udført gjentagne gange, idet jeg ved at opløse indveiede kaseinmængder i mættet kalkvand har skaffet mig 2 $^0/_0$ige neutrale opløsninger. Da der for hver 2 gram lufttørt kasein, med 1.8 gram tørsubstans, hertil medgaar 22.6 cc. kalkvand, med 0.09 $^0/_0$ *Ca*, indeholder det for lakmus neutrale kaseinat 1.1 $^0/_0$ *Ca* d. v. s. Courant og Söldners[1] dicalciumkaseinat.

Tabel XIV.

Calciumkaseinat-klorcalcium-forsøg:

Forsøgsopløsning: 2 $^0/_0$ig neutral calciumkaseinat-opløsning	normal klorkalcium-opløsning	vand	Ved mætning med klornatrium bevirkes fældning		I filtratet blev kasein paavist ved „eddikesyre“ til 0.2 $^0/_0$	„Heller“
9 cc.	0.10 cc.	0.90 cc.	+	Alle prøver var let filtrerbare.	+	+
9 —	0.15 —	0.85 —	+		+	+
9 —	0.20 —	0.80 —	+		+	+
9 —	0.25 —	0.75 —	+		?	?
9 —	0.30 —	0.70 —	+		—	—

[1] Söldner: Über das Kasein der Kuhmilch. Cfr. *Maly's Jahresbericht.* Bd. 29. (1895). S. 205.

Efter tilsætning af klorcalcium kan, som det fremgaar af tabel XIV, ogsaa dette kaseinat udsaltes, og udsaltningen er for en bestemt calciumkloridgehalt kvantitativ. Hertil udfordres 2.5 volumprocent af den molekylarnormale klorcalciumopløsning, d. v. s. 0.28 % $CaCl_2$ = 0.1 % Ca i blandingen, eller beregnet paa kaseinet ca. 5 % Ca, hvilket sammen med kaseinatets eget calcium omtrent udgjør den samme mængde som for natriumkaseinatet anført.

Som først vist af Lundberg[1] (1875—1876) kan calciumet ved ystningen erstattes af andre jordalkalimetaller.

Da jeg ved kvalitative forsøg kunde overbevise mig om, at noget lignende ogsaa gjaldt for udsaltningen med klornatrium, anstillede jeg en del kvantitative forsøg paa den samme maade, som jeg ovenfor har anført for natriumkaseinat-klorcalciumforsøgenes vedkommende. Af jordalkalier anvendtes magnesiumklorid, magnesiumsulfat og bariumklorid i molekylarnormale opløsninger, d. v. s. med henholdsvis 9.5 % $MgCl_2$, 12.0 % $MgSO_4$ og 20.8 % $BaCl_2$.

Tabellerne XV—XVII indeholder eksempler paa disse forsøg:

Tabel XV.

Natriumkaseinat-klormagnesium-forsøg:

Forsøgsopløsning:			Ved mætning med klornatrium bevirkes fældning		I filtratet blev kasein paavist ved		
					„eddikesyre"		„Heller"
2 %ig neutral natriumkaseinatopløsning	normal klormagnesiumopløsning	vand			til 0.1 %	til 0.2 %	
9 cc.	0.1 cc.	0.9 cc.	—				
9 —	0.3 —	0.7 —	+				
9 —	0.6 —	0.4 —	+		+	+	+
9 —	0.7 —	0.3 —	+		+	+	+
9 —	0.8 —	0.2 —	+	} Let filtrerbar. Klart filtrat.	+	+	+
9 —	0.9 —	0.1 —	+		?	+	+
9 —	1.0 —	0.0 —	+		—	—	?
9 —	1.1 —	0.0 —	+		—	—	—

[1] L. V. Lundberg: Smärre bidrag till kännedomen om kaseinet. *Upsala Läkareförenings Förhandlingar.* Bd. II. (1875—76). S. 343.

Tabel XVI.

Natriumkaseinat-magnesiumsulfat-forsøg:

Forsøgsopløsning: 2 %ig neutral natrium-kaseinatopløsning	normal magnesium-sulfatopløsning	vand	Ved mætning med klor-natrium bevirkes fældning	I filtratet blev kasein paavist ved „eddikesyre“ til 0.1 %	til 0.2 %	„Heller“
9 cc.	0.1 cc.	0.9 cc.	—			
9 —	0.3 —	0.7 —	+ (ubetydelig)			
9 —	0.6 —	0.4 —	+	+	+	+
9 —	0.8 —	0.2 —	+	+	+	+
9 —	0.9 —	0.1 —	+	?	?	?
9 —	1.0 —	0.0 —	+	—	—	—

Tabel XVII.

Natriumkaseinat-klorbarium-forsøg:

Forsøgsopløsning: 2 %ig neutral natrium-kaseinatopløsning	normal klor-barium-opløsning	vand	Ved mætning med klor-natrium bevirkes fældning	I filtratet blev kasein paavist ved „eddikesyre“ til 0.1 %	til 0.2 %	„Heller“
9 cc.	0.1 cc.	0.9 cc.	—			
9 —	0.3 —	0.7 —	+			
9 —	0.5 —	0.5 —	+			
9 —	0.6 —	0.4 —	+ } Let filtrerbar. Klart filtrat.	+	+	+
9 —	0.7 —	0.3 —	+	+	+	+
9 —	0.8 —	0.2 —	+	+	+	?
9 —	1.0 —	0.0 —	+	—	—	—

Af disse forsøg fremgaar, at udsaltningen ogsaa kan blive fuldstændig ved anvendelse af magnesium- og bariumsalte, at med andre ord calcium-ionerne kan erstattes af barium- og magnesium-ioner.

Jordalkali-ionerne er imidlertid ikke ligeværdige ved denne udsaltning. For at opnaa den samme virkning, det vil her sige en kvantitativ udsaltning, maa der anvendes et omtrent 3 gange saa stort antal af *Ba*- og og *Mg*-ioner som af *Ca*-ioner. Som det fremgaar af de to magnesium-forsøg, er derimod de anvendte jordalkaliers anion formentlig uden betydning.

Fænomenet maa sandsynligvis forklares paa den maade, at de udsaltbare barium- og magnesium-kaseinater har en større opløselighed i klornatriumopløsningen end de modsvarende calciumkaseinater. Dog har jeg,

paa grund af de dermed forbundne vanskeligheder, endnu ikke med sikkerhed kunnet vise, at saa er tilfældet.

Ogsaa ved udsaltningen af calciumkaseinat kan den nødvendige calciummængde erstattes af barium- og magnesium-ioner, hvad jeg gjentagne gange har kunnet overbevise mig om ved hjælp af specielle forsøg, som jeg finder det overflødigt at gjengive.

Af mine forsøg over udsaltningen af rent kasein fremgaar, at naar man betjener sig af almindeligt kogsalt, der indeholder saavel calcium som magnesium væsentlig som klorid, for at faa en fuldstændig udsaltning, vil man faa en sammenvirken af calcium- og magnesium-ioner.

Parakaseinets forhold ved kogsaltmætning.

Parakaseinets egenskab at være lettere fældbart for jordalkalisalte, navnlig klorcalcium, gjorde det paa forhaand sandsynligt, at det ikke alene skulde fældes kvantitativt af klornatrium i nærvær af jordalkalisalte, men ogsaa, at det antal jordalkali-ioner, som udfordres hertil, skulde være mindre, end jeg har fundet for kaseinet.

Til de forsøg, jeg har anstillet herover, har jeg anvendt 2 $^0/_0$ige neutrale natriumparakaseinatopløsninger, hvilke tilberedtes af rent parakasein og en beregnet mængde $^n/_{10}$ *NaOH*. Det rene parakasein har jeg fremstillet af et af mig selv fremstillet rent kasein ved at behandle dette som neutrale natriumkaseinatopløsninger med løpe ved legemstemperatur 10 minuter, derefter destruere løpet ved en rask ophedning til 90°, udfælde det dannede parakasein med eddikesyre samt rense det ved opløsning i fortyndet alkali, udfældning med syre, udvaskning med vand samt rask tørring med alkohol og æter.

De 2 $^0/_0$ige natriumparakaseinatopløsninger viste sig ved mætning med rent klornatrium ikke at give det mindste spor af fældning. Ved mætning med det almindelige kogsalt, indeholdende 0.4 $^0/_0$ *Ca* og 0.05 $^0/_0$ *Mg*, udfældes derimod parakaseinet fuldstændig, idet der hverken med Hellers reaktion eller tilsætning af saltmættet eddikesyre til 0.1 og 0.2 $^0/_0$ lykkedes at paavise æggehvide i filtratet. Heller ikke ved hjælp af den Kjeldahlske kvælstofbestemmelsesmetode viste det sig, at æggehviden i 50 cc. udgjorde en bestembar mængde.

Paa den samme maade, som jeg ovenfor har beskrevet for kaseinets vedkommende, har jeg nu søgt at bestemme den calciummængde, der fordres for at bevirke en fuldstændig fældning af parakaseinet. Da den mængde jordalkali, som maa tilføies, for flere af prøverne er tilstrækkelig til at fremkalde nogen fældning, har jeg udført forsøgene paa den maade,

at jeg paa forhaand har tilsat den afmaalte parakaseinatmængde lidt kogsalt i substans. Derved lykkedes det, ialfald delvis, at hindre en fældning ved tilsætningen af jordalkalioplesningen.

I tabel XVIII har jeg sammenstillet et udsaltningsforsøg med parakasein i nærvær af klorcalcium.

Tabel XVIII.

Natriumparakaseinat-klorcalcium-forsøg:

Forsøgsoplosning: 2 $^0/_0$ig neutral natrium-parakaseinat-opløsning	normal klor-calcium-opløsning	vand	Ved mætning med klor-natrium bevirkes fældning		I filtratet blev kasein paavist ved „eddikesyre" til 0.1 $^0/_0$	til 0.2 $^0/_0$	„Heller"
9 cc.	0.15 cc.	0.85 cc.	+		+	+	+
9 —	0.20 —	0.80 —	+	Let filtrerbar.	—	—	—
9 —	0.20 —	0.75 —	+	Klart filtrat.	—	—	—

Man vil heraf se, at der for en 2 $^0/_0$ig parakaseinopløsning fordres en tilsætning af 2 volumprocent af den normale klorcalciumopløsning, for at udsaltningen skal blive fuldstændig. Dette vil sige, at blandingen maa indeholde 0.22 $^0/_0$ $CaCl_2$ (= 0.08 $^0/_0$ Ca) eller beregnet paa parakaseinet ca. 4 $^0/_0$ Ca, hvilket som ventet er mindre end fundet for kasein.

Ogsaa for parakaseinkalkforbindelsens vedkommende viste det sig, at den kun kan udsaltes fuldstændig, naar der findes et overskud af opløseligt kalksalt i systemet. Jeg kunde derfor heller ikke her uden videre fastsætte det udsaltede parakaseinats calciumgehalt eller se, om dette havde en konstant saadan noget, som jeg efter foreløbige analyser har grund til at betvivle.

En ved opløsning af parakasein i kalkvand tilberedt neutral calciumparakaseinatopløsning, d. v. s. et calciumparakaseinat med 1.1 $^0/_0$ Ca eller dicalciumparakaseinat, viste sig i overensstemmelse med det for dicalciumkaseinatet fundne ikke at fældes af rent klornatrium. Derimod fældes det, som det fremgaar af tabel XIX, fuldstændig ved tilsætning af klorcalcium.

Den hertil nødvendige mængde udgjør 1.5 volumprocent af den normale klorcalciumopløsning, modsvarende 0.16 $^0/_0$ $CaCl_2$ = 0.06 $^0/_0$ Ca i blandingen, eller omregnet paa parakaseinet ca. 3 $^0/_0$ Ca. Dette vil sige, at den samlede calciummængde, ca. 4 $^0/_0$, er den samme, som om calciumet fra begyndelsen var tilført udelukkende som klorcalcium.

Tabel XIX.

Calciumparakaseinat-klorcalcium-forsøg:

Forsøgsopløsning:			Ved mætning med klornatrium bevirkes fældning	I filtratet blev kasein paavist ved		
2 $^0/_0$ig neutral calcium-parakaseinat-opløsning	normal klorcalcium-opløsning	vand		„eddikesyre“ til 0.1 $^0/_0$	„eddikesyre“ til 0.2 $^0/_0$	„Heller“
9 cc.	0.10 cc.	0.9 cc.	+ (Let filtrerbar. Klart filtrat.)	+	+	+
9 —	0.15 —	0.85 —	+ (Let filtrerbar. Klart filtrat.)	—	—	?
9 —	0.20 —	0.80 —	+ (Let filtrerbar. Klart filtrat.)	—	—	—

Ved udsaltningen af parakaseinatopløsningerne kan calcium erstattes af magnesium eller barium. I tabellerne XX—XXII har jeg sammenstillet nogle typiske forsøg herover.

Tabel XX.

Natriumparakaseinat-klormagnesium-forsøg:

Forsøgsopløsning:			Ved mætning med klornatrium bevirkes fældning	I filtratet blev kasein paavist ved		
2 $^0/_0$ig neutral natrium-parakaseinat-opløsning	normal klormagnesium-opløsning	vand		„eddikesyre“ til 0.1 $^0/_0$	„eddikesyre“ til 0.2 $^0/_0$	„Heller“
9 cc.	0.1 cc.	0.9 cc.	—			
9 —	0.3 —	0.7 —	+	+	+	+
9 —	0.4 —	0.6 —	+ (Let filtrerbar. Klart filtrat.)	+	+	+
9 —	0.5 —	0.5 —	+ (Let filtrerbar. Klart filtrat.)		+	?
9 —	0.6 —	0.4 —	+ (Let filtrerbar. Klart filtrat.)	—	—	—

Tabel XXI.

Natrumparakaseinat-magnesiumsulfat-forsøg:

Forsøgsopløsning:			Ved mætning med klornatrium bevirkes fældning	I filtratet blev kasein paavist ved		
2 $^0/_0$ig neutral natrium-parakaseinat-opløsning	normal magnesium-sulfatopløsning	vand		„eddikesyre“ til 0.1 $^0/_0$	„eddikesyre“ til 0.2 $^0/_0$	„Heller“
9 cc.	0.1 cc.	0.9 cc.	—			
9 —	0.4 —	0.6 —	+		+	+
9 —	0.5 —	0.5 —	+		+	?
9 —	0.6 —	0.4 —	+	—	—	—

Tabel XXII.

Natriumparakaseinat-klorbarium-forsøg:

Forsøgsopløsning:			Ved mætning med klor-natrium bevirkes fældning	I filtratet blev kasein paavist ved	
2 $^0/_0$ig neutral natrium-parakaseinat-opløsning	normal klor-barium-opløsning	vand		„eddikesyre" til 0.2 $^0/_0$	„Heller"
9 cc.	0.1 cc.	0.9 cc.	—		
9 —	0.2 —	0.8 —	+ (ubetydelig)		
9 —	0.3 —	0.7 —	+	+	+
9 —	0.5 —	0.5 —	+	+	+
9 —	0.65 —	0.35 —	+	—	—

Af disse typeforsøg fremgaar, at i lighed med det for kasein fundne kan ved udsaltningen af parakasein calcium erstattes af magnesium og barium. Dog er ogsaa her barium- og magnesium-ionerne ikke ligeværdige med calcium-ionerne, men fordres i en tre gange saa stor mængde, hvilket turde have den samme forklaring som for kaseinet anført.

De forskjelligste kaseinpræparater gir myseæggehvide i løbet af faa minuters behandling med løpe.

Efter at det var lykkedes mig at vise, at det ved mætning med almindeligt kogsalt eller eventuelt ved tilsætning af opløselige jordalkalisalte og mætning med klornatrium er muligt at salte saavel kasein som parakasein kvantitativt ud af sine opløsninger i form af jordalkalikaseinater, var det klart, at metoden var beviskraftig, naar det gjaldt paavisningen af myseæggehvide i filtratet.

Jeg kunde nu som allerede ovenfor omtalt paavise, at der ved siden af parakaseinet optraadte et nyt æggehvidestof, ikke alene naar rene natriumkaseinatopløsninger behandledes nogle minuter med løpe, men ogsaa om jeg isteden anvendte en calciumkaseinatopløsning, altsaa straks fremkaldte en synlig koagulation. Ved begge slags forsøg kunde der nemlig efter kogsaltmætning paavises, at der var fremkommet et for eddikesyre fældbart æggehvidestof, der ikke fandtes i den kontrolprøve, som i lige lang tid var behandlet med kogt løpe. Derved er det udelukket, at myseæggehviden kan være resultatet af en bakterievirkning eller en tilfældig forurensning af løpeopløsningen. Det bør ogsaa erindres, at denne karakteristiske forskjel mellem de to opløsninger allerede fremtræder efter nogle faa f. eks. 5 minuters forløb.

Efter at der i den tid, jeg har været beskjæftiget med disse undersøgelser, fra flere hold er leveret beviser for, at der ved løpningen optræder myseæggehvide, jeg nævner arbeider af Spiro[1], Petry[2], Fuld[3], behøver jeg ikke nærmere at paavise, at jeg ved mine forsøg har faaet samme resultat med en række af mig selv efter Hammarsten's metode fremstillede kaseinpræparater. Forsøget udfaldt altid paa samme maade, selv om jeg anvendte et præparat, der var renset ved 8 ganges fornyet fældning.

Dermed er jo intet bevist om, at myseæggehviden staar i direkte forbindelse med parakaseindannelsen. Den kunde, som jeg ovenfor har paapegt, repræsentere en forurensning til kaseinmolekylet, som blir i opløsning, naar dette paa ukjendt maade omdannes til parakasein.

Er denne formodning rigtig, kan man tænke sig, at den fremstillingsmaade, man anvender for at skaffe sig et rent kasein, kan være af betydning. Det kunde tænkes, at man ved at forandre fremstillingsmetoden kunde faa et kaseinpræparat uden ævne til at danne myseæggehvide under indflydelse af løpe. Man har navnlig al grund til at nære mistanke til den syrefældning, henholdsvis alkalibehandling, der indgaar i den Hammarsten'ske metode.

Jeg har derfor flere gange af melk fremstillet mig et rent kaseinpræparat ved hjælp af den anden metode, som kan anvendes hertil, nemlig udsaltning med kalkholdigt kogsalt. Efter 6 ganges fældning og opløsning i destilleret vand samt gjentagne udvaskninger med mættet kogsaltopløsning havde jeg et præparat, som var frit for alle ved kogsaltmætning opløselige æggehvidestoffe.

Dette præparat, som altsaa hverken var behandlet med syre eller alkali, eller alkohol og æter, opløstes i vand og dialyseredes mod vand i nærvær af toluol. Den saaledes vundne kaseinkalkopløsning viste sig at give myseæggehvide paa den typiske maade, medens der i filtratet fra den med kogt løpe behandlede, siden udsaltede kontrolprøve ikke fandtes noget for eddikesyre fældbart æggehvidestof.

Jeg er saaledes kommen til den anskuelse, at fremstillingsmaaden er uden indflydelse paa kaseinets ævne til at danne myseæggehvide under indflydelse af løpe.

---

[1] K. Spiro: Beeinflussung und Natur des Labungsvorganges. *Hofmeisters Beiträge.* Bd. 8. (1906). S. 364.

[2] Eugen Petry: Über die Einwirkung des Labfermentes auf Kasein. *Hofmeisters Beiträge.* Bd. 8. (1906). S. 339.

[3] E. Fuld: Über die Molkenalbumose. *Biochemische Zeitschrift.* Bd. 4, h. 4—6, juni 1907.

Tiltager mængden af myseæggehvide med indvirkningstiden?

Tiltrods for at myseæggehvide erholdes af de forskjelligste kaseinpræparater i løbet af nogle faa minuter, er dog dermed intet bevis ført for, at det er løpet selv, som bevirker dens dannelse. Myseæggehviden kan godt blive dannet ved hjælp af et proteolytisk enzym, der findes som en forurensning i løpeekstraktet. Men er det tilfældet, maa mængden af myseæggehvide efter afsluttet løpningsproces fremdeles tiltage i mængde.

Ved de første forsøg, jeg udførte i denne retning (1903 og 1904), syntes det, som om saa ikke var tilfældet[1]. Jeg iagttog nemlig, at mængden af for eddikesyre til 0.1 og 0.2 % fældbar æggehvide ikke tiltog, naar jeg isteden for at afslutte forsøget efter 10 minuters forløb, d. v. s. naar parakaseindannelsen utvivlsomt var afsluttet, lod indvirkningen af løpe fortsætte ved legemstemperatur 6 timer. Forsøgene udførtes paa den maade, at en bestemt mængde af det saltmættede filtrat afmaaltes, forsattes med eddikesyre og mængden af den opstaaede fældning bedømtes efter 24 timers forløb efter bundfaldets høide i reagensglasset. Hvis det dreiede sig om en stadig fortløbende proces, havde man, naar hensyn tages til den rigelige mængde, som dannes i løbet af de første 10 minuter, al grund til at antage, at der i den 35dobbelte tid maa dannes betydelig meget mere, selv om de dannede produkter skulde virke hæmmende paa det fortsatte arbeide. Saa viste sig imidlertid ikke at være tilfældet. Mængden af eddikesyrefældningen viste sig, bedømt efter denne grove metode, ikke at blive væsentlig forøget.

Men om der tiltrods herfor dog fandt en forøgelse sted, maatte undersøges paa anden maade. Hensigtsmæssigst for dette øiemed vilde det være at bestemme mængden af totalkvælstof i filtratet efter kogsaltmætning. Man kunde jo ikke være sikker paa, om der ikke foruden den med eddikesyre fældbare myseæggehvide i det saltmættede filtrat fandtes andre æggehvidestoffe, f. eks. fældbare med garvesyre, eller om det primært dannede myseæggehvidestof fordøiedes videre til forbindelser, der unddrog sig eddikesyrefældningen.

Jeg har derfor senere i en række prøver, dels straks efter parakaseindannelsens afslutning, dels efter længere tids forløb, bestemt mængden af totalkvælstof i filtratet ved hjælp af den Kjeldahl'ske metode. Paa denne maade kunde jeg vise, at løpets indvirkning ikke ophørte med parakaseindannelsen, men at der ved siden af denne fandt en stadig fortskridende spaltningsproces sted.

[1] Sigval Schmidt-Nielsen: Om enzymer og enzymvirkninger. W. Billes Bokförlag. Stockholm 1905. S. 46.

Efter at jeg var kommet til dette resultat, fremkom der uafhængig af mig arbeider af Petry og Spiro (l. c.) over samme spørgsmaal. Petry kunde ved hjælp af fældning med magnesiumsulfat vise, at parakaseinets egenskaber stadig forandredes; dets fældningsgrændser forandredes, det mistede ogsaa efterhaanden den karakteristiske ævne at fældes af kalksalte. Den mængde kvælstof, som fandtes i filtratet efter mætning med magnesiumsulfat, viste sig noget øget, nemlig fra 0.049 % efter 5 minuter til 0.063 % kvælstof efter 24 timer, eller i et andet eksempel fra 0.08 % efter 15 minuter til 0.119 % efter 24 timer. Hans forsøg har imidlertid ringe værdi, idet han hverken har kontrolanalyser eller har bestemt sine kaseinopløsninger. Dette tiltrods for, at man af hans forsøg kan regne sig til (l. c. s. 342—343), at han har anvendt særdeles urene løpepræparater (0.7 % *N*) i stor mængde. Man kan derfor ikke af hans data faa nogen oplysning om, hvormeget af kaseinkvælstoffet som til enhver tid er overført i myseæggehvide, hvad der er en nødvendighed for at kunne bedømme den proces, der finder sted. Spiro (l. c.) meddeler, at han uafhængig af Petry er kommen til samme resultat, men meddeler ikke nogen analysedata.

Inden jeg anfører mine analyser, maa den anvendte forsøgsanordning i korthed omtales.

Kaseinet anvendtes i 2 %ige neutrale opløsninger som natriumkaseinat. Disses kvælstofgehalt bestemtes for hvert forsøg efter Kjeldahl. Til hvert forsøg anvendtes i almindelighed 90 cc. af kaseinopløsningen og 5 cc. løpeopløsning. Dennes styrke var ved hjælp af forforsøg med melk og natriumkaseinatopløsning afpasset saa, at de 5 cc. repræsenterer det to- eller tredobbelte af den enzymmængde, som behøves for at fremkalde koagulation inden 10 minuter. Løpeopløsningerne var saa kvælstoffattige, at de kun indeholdt 0.005 til 0.016 % kvælstof. Til hver prøve, som behandledes med nativt løpe, hører en kontrolprøve af den samme natriumkaseinatopløsning, som, naar undtages, at den var tilsat med samme mængde kogt løpe som hovedprøven, fik nøiagtig den samme behandling som denne. Efter den for hvert forsøg bestemte tid blev saavel hovedprøven som kontrolprøven i løbet af 1 à 2 minuter ophedet til 90° for at dræbe enzymerne, derefter øieblikkelig afkjølet, tilsat 40 gr. af et og samme kogsalt (indeholdende 0.4 % *Ca* og 0.05 % *Mg*) og mættet hermed ved omhyggelig rivning i riveskaal. Der filtreredes efter 12 timers forløb, hvorefter kvælstoffet bestemtes i 50 cc. filtrat efter den Kjeldahl'ske metode. Ogsaa

kvælstofbestemmelserne udførtes ind i de mindste detaljer nøiagtig ligedan for hoved- og kontrolprøve. Ved den af mig trufne forsøgsanordning er alle forsøgsfeil, hvis de ikke er helt eliminerede, ihvertfald bragt ned paa et minimum og de i de forskjellige forsøg fundne værdier for mysens kvælstofgehalt derfor helt sammenlignbare med hverandre.

For at kunde finde ud, hvor stor del af det anvendte kaseins kvælstof gjenfindes i mysen, maa en tilnærmelsesvis beregning anvendes. Den anvendte kaseinopløsnings kvælstofgehalt er vistnok bestemt; men ved saltmætningen finder ikke alene en volumforøgelse, men ogsaa en udfældning sted. Naar 90 cc. kaseinatopløsning og 5 cc. løpe mættes med kogsalt, faar man et volum af ca. 110 cc., d. v. s. 50 cc. filtrat vilde modsvare 43.2 cc. af den oprindelige kaseinopløsning. Hvis man beregner vandmængden i 50 cc. filtrat og ser bort ifra, at en del af vandet er medgaaet til koloidsvælningen, faar man 44.5 cc. kaseinatopløsning. Mængden af frafiltrerbar myse udgjør 85 cc. Paa grund af disse data anser jeg mig berettiget til at antage, at 50 cc. filtrat ihvertfald svarer til halvparten af de i hvert forsøg anvendte 90 cc. kaseinatopløsning. Den ved denne beregning indførte feil kan formentlig ikke andrage til mere end analysefeilene. De i forsøgsprotokollerne anførte procent af kaseinkvælstoffet er overalt at opfatte som maksimumsværdier.

Løpningsforsøg I. Hertil anvendtes en natriumkaseinatopløsning med 0.30 % *N*. Hovedprøven paa 600 cc. tilsattes 15 cc. af den native løpeopløsning, kontrolprøven paa 200 cc. med 5 cc. af samme løpe, men i kogt tilstand. Efter henholdsvis 15 minuter og 6 timer ved 40° toges prøver af hovedportionen; de ophededes, udsaltedes etc. som oven beskrevet. Det viste sig, at der i kontrolprøvens filtrat fandtes 0.0025 %[1] *N* (fra løpet og reagenserne!), medens filtratet fra hovedprøven efter 15 min. viste en gehalt af 0.0114 % *N*, efter 6 timer 0.0153 % *N*. Efter 15 minuters forløb var der altsaa 0.089 % myseæggehvidekvælstof, efter 6 timer 0.0128 %. Det vil udtrykt paa en anden maade sige, at efter 15 minuter er 3.3 % af kaseinkvælstoffet afspaltet som myseæggehvide, efter 6 timer 4.74 %. Den oprindelige myseæggehvidemængde er altsaa forøget med 1.44 % af kaseinkvælstoffet.

Løpningsforsøg II: To hovedprøver paa 90 cc. behandles med 5 cc. løpeopløsning (4 %ig fortynding af det Blauenfeld-Tvedte'ske ekstrakt) ved 40° i henholdsvis 10 og 390 minuter. Efter fradrag af den med kogt løpe behandlede kontrolprøves kvælstofgehalt viste det sig, at mysen efter 10 minuter indeholdt 0.0092 % *N*, efter 390 minuter 0.0142 myseægge-

[1] Her som senere menes med % gram *N* i 100 cc.

hvidekvælstof. Da den anvendte kaseinopløsning indeholdt 0.232 % N, var altsaa efter 10 min. 4.41 % af kaseinkvælstoffet, efter 390 min. 6.79 % afspaltet som myseæggehvide. Med andre ord en forøgelse efterpaa af 2.38 %.

Løpningsforsøg III: Hertil anvendte jeg et præparat, som jeg velvilligst havde faaet overladt af prof. K. A. H. Mörner, der selv havde fremstillet det efter Hammarstens forskrifter. Denne kaseinopløsning indeholdt 0.25 % N. Til hver 90 cc. anvendtes 5 cc. af en 4 %ig fortynding af det Blauenfeld-Tvedte'ske løpeekstrakt. Efter fradrag af kontrolprøvens kvælstof viste det sig, at der efter 10 min. fandtes 0.0087 % N i filtratet = 3.87 % af kaseinkvælstoffet, efter 360 min. 0.0129 % N = 5.73 % af kaseinkvælstoffet, altsaa en forøgelse af 1.86 %.

Løpningsforsøg IV: Hertil anvendtes en opløsning af det samme kasein som i forsøg III, og som denne med 0.25 % N. Til hvert forsøg anvendtes 90 cc. kaseinopløsning og 5 cc. løpe. Isteden for det ordinære handelsløpe anvendte jeg dennegang et ekstrakt, som jeg selv havde tilberedt af en frisk kalvemave. Dette ekstrakt indeholdt kun 0.005 % N, d. v. s. at den kvælstofmængde, der indføres i hvert forsøg, kun modsvarer et forbrug af 0.2 cc. n/10 H_2SO_4. Kontrolprøverne opbevaredes hele forsøgstiden (henholdsvis 10 og 300 minuter) sammen med hovedprøven ved 40°. Efter fradrag af kontrolprøvens kvælstof viste det sig, at hovedprøven efter 10 minuter indeholdt 0.0095 % N, efter 300 min. 0.0134 %. Efter 10 min. var med andre ord 4.22 %, efter 300 min. 5.96 % af kaseinkvælstoffet overført i myseæggehvidekvælstof.

Løpningsforsøg Va: Portioner paa 90 cc. af en kaseinopløsning med 0.255 % N (eget præparat) behandledes ved legemstemperatur med 5 cc. af et fortyndet løpeekstrakt. Efter fradrag af kontrolprøvens kvælstof viste det sig, at filtratet fra hovedprøverne efter 10 min. indeholdt 0.0103 % N, efter 300 min. 0.0155 % N, d. v. s. at efter 10 min. var 4.49, efter 300 min. 6.75 % af kaseinkvælstoffet overført i myseæggehvidekvælstof.

Samtlige de i foranstaaende forsøg fundne data over den mængde myseæggehvidekvælstof, der er afspaltet straks efter afsluttet parakaseindannelse, som efter længere tids indvirkning er sammenstillet i tabel XXIII.

Tiltrods for at der til disse fem forsøg er anvendt saavel forskjellige kaseinpræparater som forskjellige løpeopløsninger, gir de dog alle et og samme resultat.

Tabel XXIII.

Myseæggehvidekvælstoffets øgning med digestionstiden:

Forsøg:	Myseæggehvidekvælstoffets mængde som procenter af kaseinkvælstoffet efter					Differense:
	10 min.	15 min.	300 min.	360 min.	390 min.	
I	—	(3.3)	—	(4.74)	—	1.44
II	4.41	—	—	—	6.79	2.38
III	3.87	—	—	5.73	—	1.86
IV	4.22	—	5.96	—	—	1.74
V a	4.49	—	6.75	—	—	2.26

Efter at parakaseindannelsen er tilendebragt (høist 10 minuter!), finder der fremdeles en afspaltning af myseæggehvidekvælstof sted. Men denne sekundære dannelse er dog ganske ubetydelig i forhold til den, der allerede straks indtræder. Selv i den 25 eller 39 gange saa lange tid udgjør forøgelsen ikke engang halvparten af den oprindelig afspaltede mængde. Og tiltrods for at de anvendte løpeopløsninger sikkerlig har været meget forskjellige, viser det sig dog, at den straks afspaltede mængde er mærkværdig konstant [1].

Man vil med andre ord være berettiget til at slutte, at tiltrods for, at mængden af mysekvælstof stadig tiltager, dreier det sig dog ikke om en eneste stadig fortløbende proces.

Man vil kanske frakjende mine ovennævnte forsøg beviskraft ved at sige, at tiltrods for, at der ved forforsøg var fastsat, at den tilsatte løpemængde udgjorde det 2- eller 3-dobbelte af den mængde, som tiltrænges for at bevirke parakaseindannelse i løbet af 10 minuter, forholdet dog skulde blevet et andet, hvis en høiere enzymkoncentration anvendtes. Jeg har derfor anstillet et særskilt forsøg.

Løpningsforsøg V b: Af den samme kaseinopløsning (med 0.255 % *N*), som anvendtes til forsøg V a, blev 90 cc. behandlet med 5 cc. af det samme løpeekstrakt som anvendt i nr. V; men medens dette i forsøg V a anvendtes i en 4 %ig fortynding, anvendtes en 16 %ig til forsøg V b. Iøvrigt var forsøgsbetingelserne fuldstændig lige. Det viste sig efter fradrag af kontrolprøvernes kvælstof, at der efter 10 min. ved 40° fandtes 0.0097 % *N* i filtratet, efter 300 min. 0.0176 % *N*.

Efter 10 minuters forløb var altsaa med den 16 %ige løpeopløsning 4.23 % af kaseinkvælstoffet overført i mysekvælstof, efter 300 min. 7.63 %.

[1] Forsøg I viser vistnok en større afvigelse; men dette hidrører fra, at selve kaseinopløsningens N-gehalt, som det siden viste sig, blev bestemt for høit.

Ved sammenligning med de under forøvrigt lige betingelser i forsøg V a fundne værdier for en 4 %ig løpeopløsning (henholdsvis 4.49 og 6.75 %) vil man se, at tiltrods for den firedobbelte enzymmængde har den straks afspaltede mængde af mysekvælstof holdt sig konstant, medens mængden sekundært afspaltet er tiltaget.

Man faar heraf straks det indtryk, at den sekundære forøgelse maa skyldes et andet agens end selve det parakaseindannende.

Rigtigheden af denne formodning bekræftes af efterfølgende forsøg.

Løpets indvirkning paa parakaseinopløsninger.

Det parakasein, jeg anvendte, har jeg selv fremstillet af mine reneste kaseinpræparater paa samme maade som under udsaltningsforsøgene (s. 30) omtalt. Af tørpræparaterne tilberedtes en 2 %ig neutral opløsning med $^n/_{10}$ *NaOH*. Forsøgsanordningen var saavel med hensyn til løpemængde, ophedning, udsaltning, kvælstofbestemmelserne, resultaternes beregning etc. for saavel hovedprøve som kontrolprøve nøiagtig den samme som ovenfor (s. 36) angivet.

F o r s ø g VI: Af en natriumparakaseinatopløsning med 0.259 % kvælstof behandledes prøver paa 90 cc. med 5 cc. af en 4 %ig fortynding af løpeekstrakt henholdsvis 10 og 300 min. ved 40°. Efter fradrag af kontrolprøvens kvælstof viste det sig, at filtratet efter 10 min. indeholdt 0.0003 % *N*, efter 300 min. 0.0037 % *N*. Det vil sige, at efter 10 min. 0.13 % af parakaseinkvælstoffet var omdannet til mysekvælstof, efter 300 min 1.59 %.

F o r s ø g VII: Parakaseinatopløsningen indeholdt 0.303 % *N*. Af denne opløsning behandledes 90 cc. i henholdsvis 10 og 300 min. ved 40° med 5 cc. af den samme løpeopløsning som anvendt i forsøg IV. Efter fradrag af kontrolprøvernes kvælstof viste det sig, at hovedprøven efter 10 min. havde 0.0010 % *N*, efter 300 min. 0.0039 % *N*. Efter 10 minuters forløb var med andre ord 0.36, efter 300 minuters forløb 1.43 % af parakaseinkvælstoffet omdannet i mysekvælstof.

Disse to forsøg, der er udført ved den selvsamme løpekoncentration som i forsøg III og IV, viser os, at en sikker maalbar omdannelse af parakaseinet først lader sig paavise efter længere tids forløb. Jeg har vistnok fundet, at der allerede i løbet af de første 10 min. skulde gaa parakasein i opløsning; men den fundne mængde ligger indenfor feilgrændserne. Foruden disse forsøg har jeg ogsaa udført en del andre, med hvilke jeg særskilt vilde undersøge, hvorvidt en sikker maalbar opløsning allerede fandt sted i løbet af de første 10 minuter. Det viste sig, at hovedprøven snart

viste lidt mere, snart ogsaa lidt mindre kvælstof end kontrolprøven, d. v. s. ± 0.05 à 0.1 cc.

Den sekundært optrædende forøgning af mysekvælstoffet viser sig at være af samme størrelse som den spaltning af parakaseinet, der finder sted, naar dette behandles med løpe under de samme forsøgsbetingelser.

Heraf drager jeg den slutning, at den sekundære forøgelse af det med kogsalt ikke udsaltbare kvælstof ikke skyldes selve det parakaseindannende enzym, løpet eller chymosinet, men en dette medfølgende parakasein-protease.

Man vil kunne søge et yderligere bevis for, at den sekundære forøgelse af mysekvælstoffet er at føre tilbage paa en forurensende protease deri, at parakaseindannelsen og proteasevirksomheden i sin afhængighed af enzymkoncentrationen ikke følger samme lov. Det gjælder som ubestridelig bevist for løpets indvirkning paa kaseinet, at den er direkte proportional med løpekoncentrationen. I forsøg VIII gjengiver jeg et eksempel paa, at det aldeles ikke er tilfældet med parakaseinets fordøielse med løpeopløsningernes protease.

Forsøg VIII: Af en natriumparakaseinatopløsning med 0.259 $^0/_0$ N blev tre prøver paa 90 cc. ved 40° i 300 minuter behandlet med 5 cc. løpe indeholdende henholdsvis 5 $^0/_0$, 20 $^0/_0$ og 80 $^0/_0$ af et løpeekstrakt. Efter fradrag af kontrolprøvernes kvælstof viste det sig, at prøverne indeholdt henholdsvis 0.0034 $^0/_0$ N, 0.0063 $^0/_0$ N og 0.0118 $^0/_0$ N.

Til mysekvælstof var altsaa overført:

Ved enzymkoncentration	1	. . . 1.46 $^0/_0$	af	kaseinkvælstoffet
» —»—	4	. . . 2.70	»	—»—
» —»—	16	. . . 5.06	»	—»—

Parakaseinets fordøielse af den forurensende protease følger saaledes ikke enkel proportionalitet til enzymkoncentrationen, men temmelig nøiagtig dens kvadratrod, d. v. s. den Schütz-Borrisow'ske lov.

Slutning.

Ved de af mig udførte undersøgelser har jeg ikke kunnet føre beviser for rigtigheden af den af russiske forskere først fremsatte formodning, at mavesaftens pepsin og løpe skulde være et og samme enzym. Det forekommer mig tværtom, at jeg har ført bindende beviser for, at mavesaftens æggehvidefordøiende og melkekoagulerende egenskab maa være uafhængig af hverandre. Foruden det ordinære løpe maa mavesaften indeholde mindst et andet enzym, der virker melkekoagulerende, men vel at mærke kun ved en svagt sur reaktion. Hvorvidt dette er pepsin eller et tredie hidtil ikke bekjendt proteolytisk enzym, kan ikke afgjøres, før pepsin og løpe er fremstillede i en virkelig ren tilstand. Efter disse iagttagelser kan det ikke noksom indskjærpes, at alle koagulationsforsøg med melk og mavesaft maa udføres ved en strængt neutral reaktion, hvad enten det gjælder en klinisk undersøgelse paa løpe eller en videnskabelig undersøgelse. Ved sur reaktion blir koagulationsprøven en generel reaktion paa forekomsten af proteolytiske enzymer i sin almindelighed.

Der er ved de forsøg, jeg har beskrevet i dette arbeides anden del, ført bindende beviser for, at afspaltningen af myseæggehvide staar i den aller nøieste forbindelse med løpets indvirkning paa kaseinmolekylet. Ved løpets indvirkning paa kasein dannes myseæggehvide, samtidig som kaseinet overgaar i parakasein. Hvorvidt denne proces kan opfattes som en enkelt hydrolytisk spaltning, kan endnu ikke afgjøres, idet parakaseinets kemi er alt for lidet kjendt.

Hvad myseæggehviden angaar, saa er den utvivlsomt af albumosenatur. Den dannes i en mængde af ca. 4 $^0/_0$ af kaseinmolekylets kvælstof. Jeg har søgt at fremstille den i ren tilstand; men vanskeligheden at befri den fra kogsaltet har gjort, at jeg ikke har faaet en til analyse tilstrækkelig kvantitet. Det kan forresten heller ikke med sikkerhed paastaaes, at der kun afspaltes et eneste stof, ihvorvel det turde være overveiende sandsynligt. Ved længere tids indvirkning af løpe øges den pri-

mært dannede myseæggehvides mængde, idet en forurensende protease fordøier parakaseinmolekylet. Det er jo ikke udelukket, at ogsaa myseæggehviden selv herunder undergaar en yderligere forandring.

Efter at det nu er vist, at kaseinet spaltes i parakasein og myseæggehvide, en eiendommelig hydrolytisk spaltning, der nærmest har et sidestykke i hæmoglobinets spaltning i globin og hæmatin, staar det tilbage at berøre spørgsmaalet, om dette kan hjælpe os paa vei til at klargjøre løpets saa gaadefulde fysiologi.

Vi er jo fra fordøielseslæren vante til, at ethvert enkelt enzyms kemiske arbeide har en bestemt opgave at fylde. Er det nu muligt, at løpets er den at afspalte myseæggehvide? Kan det tænkes, at dette er en forberedelse til den yderligere nedbrydning af kaseinmolekylet, som vi ved maa finde sted før resorptionen finder sted? Isaafald var løpets fysiologiske betydning klargjort. Men derom er det for tidligt at have nogen endelig mening. Dog synes det isaafald at staa i strid med, hvad vi kjender om forløbet af fordøielseskanalens opløsningsarbeide forøvrigt.

Erindrer vi os, at mavesaften i sin almindelighed — i overensstemmelse med den udmærkede økonomi, som organismerne altid viser med sine resurcer — altid er rigest paa de hjælpemidler, som der i det givne øieblik er mest brug for, skulde vi vente, at mavesaften var rigest paa løpe, naar dens afsondring fremkaldtes af melk. Dette skal efter Pawlows, Blum og Boehme's m. fl. undersøgelser ikke være tilfældet; men disse undersøgelsers metodik kan være feilagtig.

Men selv om vi nu kunde gaa ud fra, at løpets betydning for pattedyrene var den at lette kaseinets fordøielse, saa vil det være indlysende, at det ikke kan have denne betydning alle de steder, hvor det aldrig kommer sammen med kasein. Denne kan derfor heller ikke være dets fysiologiske opgave.

Men paa den anden side tyder den almene udbredelse af enzymer, som ved neutral eller svagt alkalisk reaktion bevirker en omdannelse af melkens kasein, saa at en koagulation kan finde sted, ubetinget paa, at disse proteolytiske enzymer har en generel fysiologisk betydning, — men hvilken?

For tiden er det ikke muligt at give noget svar herpaa; men det kunde kanske tænkes, at det, vi hidtil har anseet som løpets karakteristiske virkning, nemlig kaseinets omdannelse til parakasein under afspaltning af myseæggehvide, er et ligegyldigt bifænomen, der ikke staar i direkte forbindelse med disse ved neutral reaktion virkende proteolytiske enzymers fysiologiske betydning, at denne med andre ord overhovedet ikke har

noget med kasein og melk at gjøre. Men selv om dette ved senere forskninger skulde vise sig, at blive tilfældet, vil det dog have sin store interesse at faa yderligere kjendskab til parakaseindannelsens kemi. Denne er fremdeles lige gaadefuld og frembyder stor teoretisk interesse, selv om den ikke har nogen almindelig fysiologisk betydning.

Christiania den 30te september 1907.

Efterskrift.

Idet dette arbeide skal afleveres til trykning, er det mig en kjær pligt at kunne udtrykke min taknemlighed for den hjælp, jeg har faaet til disse undersøgelsers udførelse ved tildelelsen af stipendier fra »Houens legat« samt ved »Smitt'ska understödet« af »Stockholms Högskolas Lärareråd«. — Til professorerne Olof Hammarsten og Carl Th. Mörner beder jeg at faa udtale en oprigtig tak for al den elskværdige imødekommenhed, de viste mig under de aar, jeg paa med.-kem. laboratoriet i Uppsala var beskjæftiget med dette arbeide.

Til slut beder jeg at faa paapege, at der, efterat nærværende afhandling var færdigskrevet, af I. W. A. Gewin er offentliggjort (*Hoppe-Seylers Zeitschrift*. Bd. 54 h. 1 10de december 1907) et arbeide til fordel for den formentlige identitet. Paa mig har Gewins forsøg ikke paa nogen maade virket overbevisende; men jeg finder ikke at kunne optage dem til indgaaende diskussion uden nye forsøg, navnlig da de i den nærmeste fremtid vil blive imødegaaede fra andet hold. Som jeg ovenfor har fremholdt, er der lige megen grund til at søge en identitet mellem løpet og et hvilketsomhelst andet proteolytisk enzym (f. eks. erepsin, bakterieproteaser etc.) som med pepsin.

Derimod kan jeg, som jeg forøvrigt allerede maaneder før fremkomsten af Gewins arbeide har udtalt (se ovenfor), være enig med ham i, at det eiendommelige ved løpet ikke saa meget er at søge i selve enzymet som i substratet, d. v. s. i kaseinet.

Christiania 30te januar 1908.